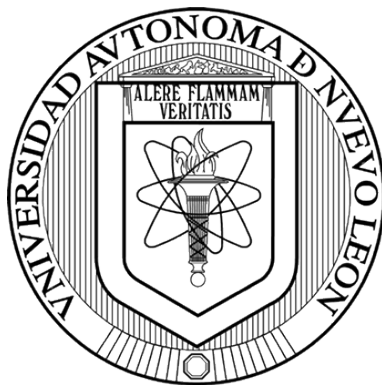


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



EVALUACIÓN DE *Bacillus sp.* COMO POTENCIAL PRODUCTOR DE UN
EXOPOLÍMERO CON ACTIVIDAD SURFACTANTE.

Por:

MARYANGEL CAMACHO MORENO

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS con
orientación en Microbiología Aplicada.

Octubre, 2018.

“Evaluación de *Bacillus sp.* como potencial productor de un exopolímero con actividad surfactante”.

Revisión de la tesis:

Dr. Edgar Allan Blanco Gámez
ASESOR

Dr. Ulrico Javier López Chuken
COMITÉ TUTORIAL

Dr. José Rubén Morones Ramírez
COMITÉ TUTORIAL

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño
COMITÉ TUTORIAL

“Evaluación de *Bacillus sp.* como potencial productor de un exopolímero con actividad surfactante”.

Aprobación de la tesis:

Dr. EDGAR ALLAN BLANCO GÁMEZ

Presidente

Secretario

Vocal

DRA. MA. ARACELI HERNÁNDEZ RAMÍREZ

Sub-directora de estudios de posgrado

RESUMEN

Maryangel Camacho Moreno

Fecha de grado: Octubre, 2018.

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del estudio: EVALUACIÓN DE *Bacillus* sp. COMO POTENCIAL
PRODUCTOR DE UN EXOPOLÍMERO CON ACTIVIDAD SURFACTANTE.

Número de páginas: 60

Candidato para el Grado de Maestría en
Ciencias con Orientación en
Microbiología Aplicada

Área de estudio: Microbiología Aplicada

Actualmente existen diversos surfactantes de origen sintético cuyas aplicaciones varían de acuerdo con la clasificación del mismo. Estos compuestos son ampliamente utilizados a nivel industrial, sin embargo, no son amigables con el medio ambiente por no ser biodegradables. Los biosurfactantes (BS) han surgido a colación como una opción eco-amigable frente a los compuestos de origen sintético. La principal problemática que presentan estos BS radica en los altos costos de producción aunados a los sustratos utilizados como materia prima y a los procesos de extracción y purificación de los mismos. Con el objetivo de disminuir dichos costos, se han planteado diversas fuentes de carbono provenientes de sustratos renovables. Este proyecto abarcó la determinación de la actividad surfactante de un exopolímero producido por una bacteria *Bacillus* sp. utilizando como fuente de carbono aceite vegetal, en donde se encontró el exopolímero presenta una actividad menor en comparación a los surfactantes sintéticos, utilizando el índice de emulsificación como parámetro de medición.

Firma del asesor: _____

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por la beca otorgada.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por las instalaciones brindadas en donde se llevó a cabo el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. E. Allan Blanco G. por su amistad y apoyo incondicional brindado desde el principio de esta travesía.

A la Dra. María Elena Cantú por la ayuda brindada desde el comienzo de mis estudios de maestría.

A mi comité tutorial por las observaciones y correcciones realizadas para el beneficio del proyecto.

A los profesores de la maestría por conocimientos los conocimientos impartidos, los cuales fueron esenciales para la comprensión y ejecución del proyecto.

A mis compañeros de clase y a mis amigos del laboratorio Patty, Juli y Ulises que sin su ayuda, ocurrencias y mucha diversión, esta travesía no hubiese sido la misma.

Dedicatoria

A mi familia

A mi abuelo Julio Alberto Moreno[†].



TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
LISTA DE TABLAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
ABREVIATURAS.....	xii
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
Clasificación y composición de los biosurfactantes	4
Síntesis de los biosurfactantes	7
Extracción de biosurfactantes	10
Purificación de biosurfactantes.....	11
Identificación y caracterización de biosurfactantes.....	11
Pruebas preliminares para confirmar la actividad superficial de los BS	12
Aplicaciones de los biosurfactantes	13
Antecedentes	14
Justificación	16
CAPÍTULO II	17
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
Hipótesis.....	17
Objetivos	17
CAPÍTULO III	19
MATERIALES	19
Muestras y materiales.....	19
Equipos y reactivos.....	20
METODOLOGÍA	22
1. Crecimiento de cultivos bacterianos.....	22
2. Extracción del BS.	24
3. Estudio de estabilidad del BS.	25
4. Determinación de la actividad surfactante.....	26
5. Determinación de la actividad antibacteriana.	26
6. Optimización de la producción de BS.....	27
7. Purificación del BS.	28
8. Caracterización del BS.	28
9. Disposición de residuos.....	28

CAPÍTULO IV	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
1. Crecimiento de cultivos bacterianos.....	29
2. Extracción del BS.	38
3. Estudios de estabilidad del BS.....	38
4. Determinación de la actividad surfactante.	41
5. Determinación de la actividad antibacteriana.	42
6. Optimización de la producción de BS.....	43
7. Purificación del BS.	48
8. Caracterización del BS.	48
CAPÍTULO V	50
CONCLUSIONES	50
PERSPECTIVAS	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los surfactantes según su carga	6
Tabla 2. Pruebas preliminares para la evaluación de actividad superficial.	12
Tabla 3. Especies de <i>Bacillus</i> productoras de biosurfactantes.....	15
Tabla 4. Equipos utilizados para la realización del proyecto	20
Tabla 5. Reactivos utilizados para la realización del proyecto.	21
Tabla 6. Componentes del medio de cultivo PET y PET modificado.....	22
Tabla 7. Variables evaluadas en el diseño factorial completo general.	27
Tabla 8. Variables evaluadas en el diseño de optimización de la producción del BS.	27
Tabla 9. Índices de emulsificación obtenidos a partir del medio de cultivo PET sin modificar y del medio de cultivo PET modificado.....	35
Tabla 10. Comparación de los E24 obtenidos de las bacterias <i>B. licheniformis</i> LB 04 y la 1.1 a partir de distintas fuentes de carbono con la referencia	37
Tabla 11. Índice de emulsificación de los polímeros producidos por <i>B. licheniformis</i> LB 04 y por la bacteria 1.1 a diferentes pH.	37
Tabla 12. Diseño factorial completo general.	44
Tabla 13. Diseño de superficie de respuesta tipo Box- Behnken.	45
Tabla 14. Análisis de varianza.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Producción de BS durante el crecimiento microbiano	2
Figura 2. Distribución porcentual aproximada para la literatura disponible sobre diversos sustratos renovables utilizados para la producción de biosurfactantes 4	
Figura 3. Estructuras de BS.	5
Figura 4. (a) Disposición de las micelas según el medio en el que se encuentren; (b) Estructuras micelares diversas.	7
Figura 5. Metabolismo relacionado a la síntesis de precursores de biosurfactantes, utilizando como fuente carbono sustratos inmiscibles con el agua como hidrocarburos.....	9
Figura 6. Imágenes del microscopio óptico (100X) usando el método de tinción de Gram de las cepas bacterianas reactivadas en caldo PET.	29
Figura 7. Producción de exopolímeros utilizando aceite de canola como única fuente de carbono.	31
Figura 8. Índice de emulsificación (E24) de las cepas bacterianas a diferentes tiempos de la fermentación.	32
Figura 9. Índices de emulsificación obtenidos a partir del medio de cultivo PET (a) sin modificar y (b) modificado.	35
Figura 10. Imágenes de los BS	38
Figura 11. Efecto del pH sobre la actividad del BS	39
Figura 12. Efecto de la temperatura sobre la actividad del BS.....	40
Figura 13. Efecto de la concentración de NaCl sobre la actividad del BS	41
Figura 14. Índice de emulsificación (E24) frente a distintos compuestos inmiscibles.....	42
Figura 15. Actividad antibacteriana del BS frente a <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i>	43
(a) (b)	44
Figura 16. Gráficas de efectos de las variables sobre la producción de BS. (a) Cantidad de polímero en mg vs velocidad de agitación en rpm. (b) Cantidad de polímero en mg vs tipo de fuente de carbono.	44
Figura 17. Gráficas de superficie de respuesta.	47
Figura 18. Espectro de FT-IR del BS sin purificar y purificado.	49

ABREVIATURAS

°C	grados Celsius	mm	milímetros
μL	microlitros	N	normalidad
BS	biosurfactante	NR	no reportado
CCM	concentración crítica micelar	Ø	diámetro interno
CHAPS	(3 - ((3-cholamidopropil) dimetilamonio) -1-propanosulfonato)	p/v	peso/ volumen
CTAB	bromuro de trimetilamonio de cetilo	PET	para microorganismos extremófilos
Da	dalton	PFOA	perfluorononanoato
DO	densidad óptica	PFOS	perfluorooctanosulfonato
DHA	dihidroxiacetona	pH	potencial de hidrógeno
E24	índice de emulsificación	rpm	revoluciones por minuto
g	gramos	SDS	dodecil sulfato de sodio
L	litros	SLES	éter lauril sulfato de sodio
mL	mililitros	TI	tensión interfacial
		TS	tensión superficial
		UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los surfactantes son moléculas anfipáticas que presentan la capacidad de disminuir la tensión superficial e interfacial. Son sintetizados químicamente y la mayoría de ellos son derivados del petróleo. Además, son de gran importancia comercial debido su gran variedad de aplicaciones, lo cual implica, que los seres humanos estemos en constante contacto con estos compuestos durante la realización de nuestras actividades básicas ya que se encuentran presentes en artículos de higiene personal, como jabones y pastas dentales, productos cosméticos y hasta en productos farmacéuticos.

Los surfactantes al no ser biodegradables son considerados compuestos ecotóxicos, ya que afectan directamente las características del medio ambiente en el cual son desechados los productos que lo contienen (Makkar y Cameotra, 1999a, b).

Por lo que a partir de algunos años atrás, se ha observado un gran interés por parte de muchos investigadores en todo el mundo y por consiguiente a nivel industrial, hacia el empleo de biosurfactantes durante los procesos (Ishigami, 1997).

Los biosurfactantes (BS) son considerados agentes versátiles y representan una opción muy atractiva a nivel industrial, debido a las diversas ventajas que presentan con respecto a los de origen sintético tales como, son biodegradables por lo que conllevan a niveles mínimos de contaminación o toxicidad, pueden ser obtenidos a partir de sustratos renovables y presentan mayor estabilidad frente a condiciones extremas de temperatura, pH y concentración de NaCl (Makkar *et al.*, 2011).

Los BS son compuestos catalogados como biopolímeros de tipo “A” ya que son compuestos de origen microbiano; además son considerados exopolímeros (EPS) por ser sintetizados a nivel extracelular.

Los EPS son producidos principalmente como mecanismo de protección frente a entornos que presenten condiciones extremas en términos de

temperatura, pH, niveles de salinidad, presencia de compuestos tóxicos y elevadas concentraciones de radiación (Nicolaus *et al.*, 2010; Harutoshi, 2013), induciendo una respuesta bioquímica compleja en el microorganismo (Hvidsten *et al.*, 2015); o como estrategia de adaptación celular al tener una baja biodisponibilidad de la fuente de carbono, la cual puede estar inmersa en una fuente inmiscible con el medio en el que se encuentran los microorganismos en cuestión (Rosenberg y Ron, 1999).

La adaptación bioquímica se puede ver manifestada claramente mediante la producción de metabolitos secundarios (Genilloud *et al.*, 2011, Ruiz *et al.*, 2010), los cuales son variados en cuanto a estructura y bioactividad; un ejemplo de ello, son los biosurfactantes, los cuales son producidos en la fase logarítmica tardía del crecimiento microbiano y/o en la fase estacionaria (ver figura 1).

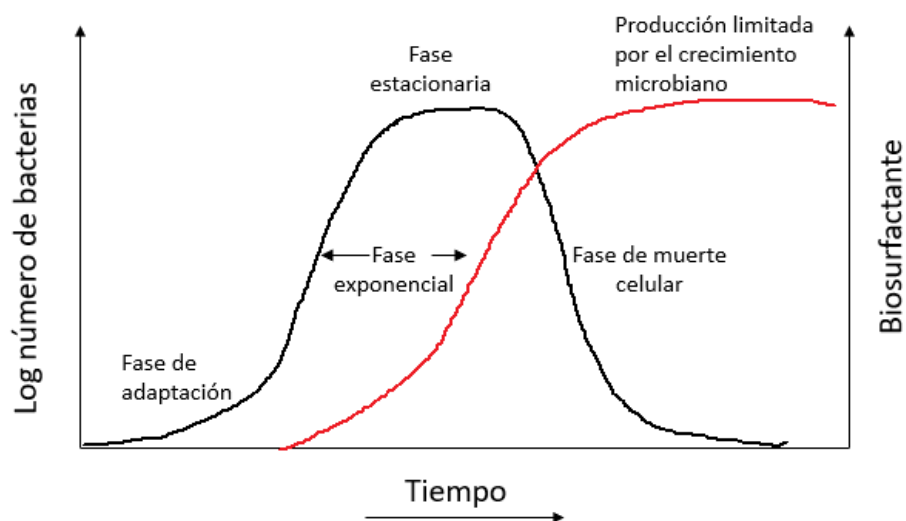


Figura 1. Producción de BS durante el crecimiento microbiano (gráfica modificada de Mulligan y Gibbs, 2004).

La mayoría de los BS son producidos a partir de sustratos inmiscibles con el agua, como los hidrocarburos (Syldatk y Wagner, 1987) y para poder consumir esta fuente de carbono, los microorganismos son capaces de producir estos compuestos, generando la disminución en la tensión superficial e interfacial del medio.

Sin embargo, la actividad superficial no sólo se atribuye a la producción del biosurfactante. Ésta también puede ser percibida como una combinación de estrategias para promover su adaptación, que abarca la producción de biosurfactantes para mejorar la biodisponibilidad de los sustratos inmiscibles de una manera controlada, es decir, mediante interacciones hidrofóbicas y la modificación de las propiedades de la membrana celular para evitar la división no controlada del sustrato (Harms *et al.*, 2010).

No obstante, la producción a gran escala de los BS no ha dado una respuesta satisfactoria a nivel económico, debido a los altos costos de producción que estos últimos involucran, aunados principalmente a los costos de los sustratos del medio de cultivo y a los procesos de extracción y purificación de estos compuestos. Para solventar esta problemática, muchos han sido los estudios que se han llevado a cabo, teniendo en consideración la relación costo/ beneficio, para poder competir directamente en el mercado con los surfactantes, dando lugar a la implantación de procesos sustentables (Rodrigues *et al.*, 2006).

Algunas de las alternativas que se han propuesto para disminuir los costos, implican la utilización de sustratos como fuentes de carbono que son relativamente económicos y que se encuentran disponibles en diversos sectores industriales (Banat *et al.*, 2014b) (ver figura 2). Por ejemplo:

- Industria procesadora de alimentos y de aceites: grasas y aceites oxidados comestibles, aceite de oliva, cáscaras de papa, aceite de colza, de girasol, aceites vegetales, derivados de coco, canola, agua cacahuete, soya, además de cultivos de yuca, papa, camote, soya, remolacha dulce y sorgo.
- Desechos de productos lácteos y destilería: derivados de la leche y efluentes industriales.
- Desechos agroindustriales: salvado de trigo, melaza de remolacha y de caña de azúcar, bagazo de caña de azúcar, mandioca y sus derivados, paja de arroz, etc.
- Industria de grasas y aceites animales: grasas y aceites de origen animal.

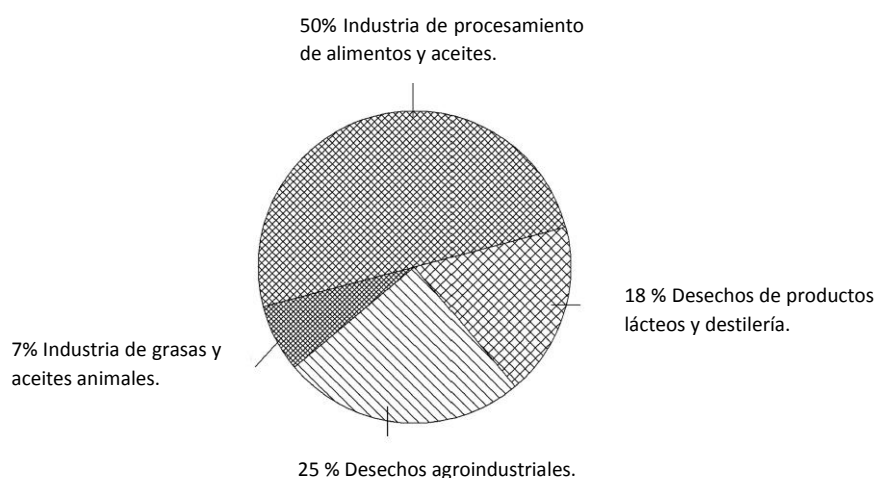


Figura 2. Distribución porcentual aproximada para la literatura disponible sobre diversos sustratos renovables utilizados para la producción de biosurfactantes (Banat *et al.*, 2014b).

Este estudio propone el empleo de aceites vegetales de uso comercial como única fuente de carbono para la producción de BS siguiendo la ruta biotecnológica a partir de la adaptación al medio de cultivo, selección de cepas de microorganismos potencialmente productores, la selección de la fuente de carbono ideal para el medio de cultivo, hasta las condiciones de cultivo, extracción, purificación y caracterización del BS en cuestión.

Clasificación y composición de los biosurfactantes

Los BS pueden ser de bajo peso molecular como glucolípidos en forma de ésteres de azúcar y éteres, fosfolípidos, ácidos grasos y lipopéptidos cíclicos o lineales, lipoproteínas y alcoholes; o pueden ser moléculas de alto peso molecular constituidos por biopolímeros anfipáticos, en su mayoría polisacáridos asociados a complejos protéicos (Janek *et al.*, 2010; Moo-Young, M., 2011) (ver figura 3).

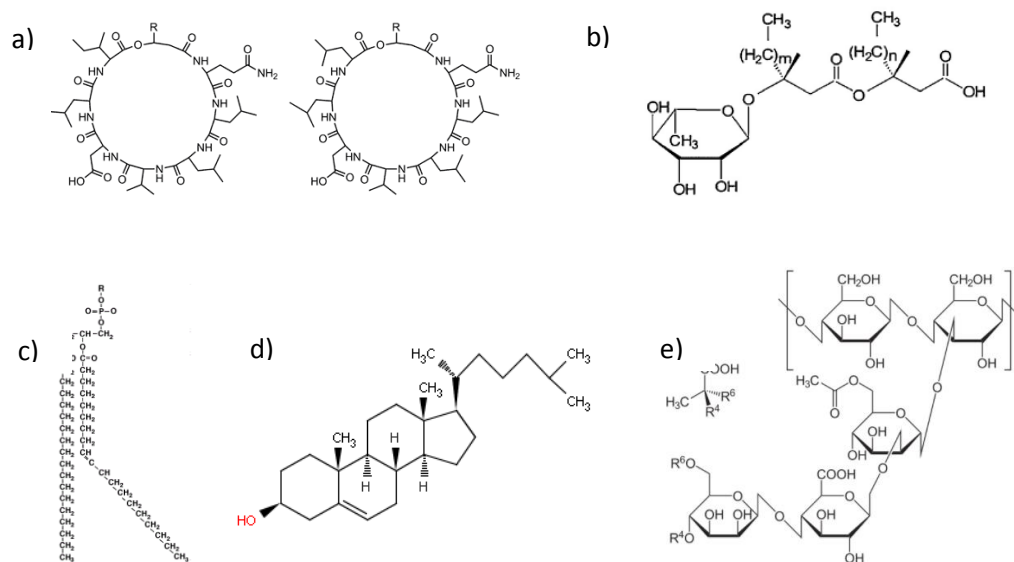


Figura 3. Estructuras de BS. a. Lipopéptidos (lichenisina A y surfactina, respectivamente), b. Glucolípido (ramnolípido), c. Fosfolípido, d. Lipoproteína (colesterol) y e. Exopolisacárido (Xantano).

A comparación de los BS, los surfactantes de origen sintéticos son clasificados, según su carga, en iónicos (catiónicos y aniónicos), no iónicos y anfotéricos (ver tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los surfactantes según su carga (tabla modificada de Chen *et al.*, 2015; Salager, 2002).

Tipo de surfactante	Grupo funcional	Surfactante	Usos
Aniónicos	Sulfatos	SDS	Detergentes, jabones, agentes espumantes y humectantes.
	Sulfonatos	PFOS	
	Ésteres de fosfato	SLES	
	Carboxilatos	PFOA	
Catiónicos	Aminas pH dependientes	Dihidrocloruro de octenidina	Suavizantes, actividad antibacteriana e inhibidores de corrosión.
	Sales de aminas cuaternarias	CTAB	
Anfotéricos	Alquil betaínas	Cocamidopropil betaína	Agentes espumantes, humectantes y emulsionantes.
	Alquil dimetilaminas	CHAPS	
No iónicos	Ácidos carboxílicos	Tritón X-100	Detergentes líquidos, humectantes, espumantes y emulsionantes.
	Ésteres de carbohidratos	Decil glucósidos	
	Glicéridos	Laurato de glicerilo	
	Ésteres de hexitoles y de anhidrohexitol es cíclicos	Sorbitan, SPAN, TWEEN	

Los BS están formados por moléculas anfipáticas que tienen la propiedad de disminuir la tensión superficial e interfacial entre dos fases de distinta polaridad, mediante la formación micelas, generando la dispersión del hidrocarburo o compuesto inmiscible en la fase acuosa, dando lugar a una emulsión (Amodu *et al.*, 2014).

Las micelas están compuestas por una cabeza hidrofílica (ácidos, cationes o aniones de péptidos, mono-, di- o polisacáridos) y una cola hidrofóbica (cadenas de hidrocarburos saturados o insaturados o ácidos grasos) (Moya *et al.*, 2015). Dependiendo del tipo de medio en el que se encuentre, agua en aceite o aceite en agua, estas micelas dispondrán su parte hidrofóbica hacia el exterior y la hidrofílica hacia el interior o viceversa, respectivamente. Adicionalmente, éstas pueden congregarse dando lugar a diferentes estructuras (ver figura 4).

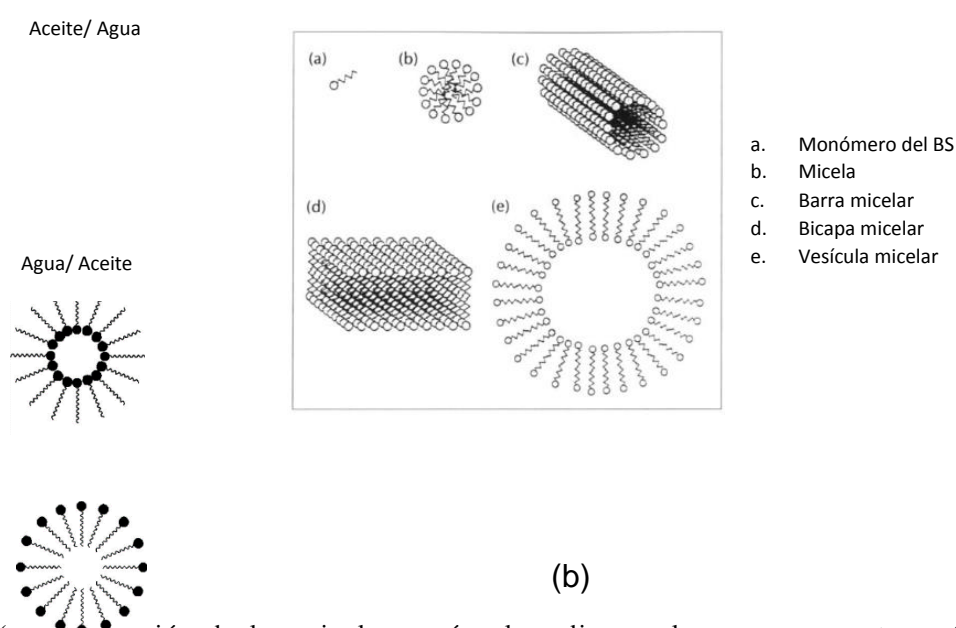


Figura 4. (a) Disposición de las micelas según el medio en el que se encuentren; (b) Estructuras micelares diversas.

Síntesis de los biosurfactantes

La síntesis de los BS consta de cuatro etapas principales, consumo del sustrato presente en el medio de cultivo por parte de las células microbianas, el metabolismo del sustrato para generar los precursores del BS, la incorporación de la parte hidrofílica a la hidrofóbica o viceversa del BS y finalmente la liberación del BS hacia el exterior celular (Rosenberg *et al.*, 2013).

En primer lugar, el microorganismo consume los sustratos de los cuales obtendrá la fuente de carbono, nitrógeno, sales, etc. Si la fuente de carbono se encuentra inmersa en una matriz de naturaleza miscible con el agua, como por

ejemplo carbohidratos, o bien en una insoluble con ésta, como lo son los hidrocarburos o aceites, las vías metabólicas a seguir son diferentes.

En el presente trabajo la fuente de carbono está representada por un compuesto inmisible con el agua (aceite vegetal), el mecanismo a seguir se dirige principalmente a la ruta lipolítica y la gluconeogénesis, lo que permite su uso para la producción de ácidos grasos y/o azúcares.

El mecanismo de consumo del compuesto inmisible a través de la membrana celular del microorganismo no se ha sido establecido de manera clara.

Sin embargo, una vez emulsificado el aceite en la fase acuosa del medio, se tienen microgotas de menor tamaño que la célula bacteriana, éstas son consumidas por la bacteria (Watkinson y Morgan, 1991; Desai y Banat, 1997) y la síntesis comienza a través de la β - oxidación de los ácidos grasos que da lugar a la formación de lípidos y moléculas de Acetil Coenzima A (Acetil CoA) el cual ingresa al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Ciclo de Krebs), en donde el intermediario oxalacetato se transforma en piruvato, que actúa como precursor de la gluconeogénesis, proceso metabólico en el cual se da lugar a la glucosa y a otros azúcares (Santos *et al.*, 2016). (Ver figura 5)

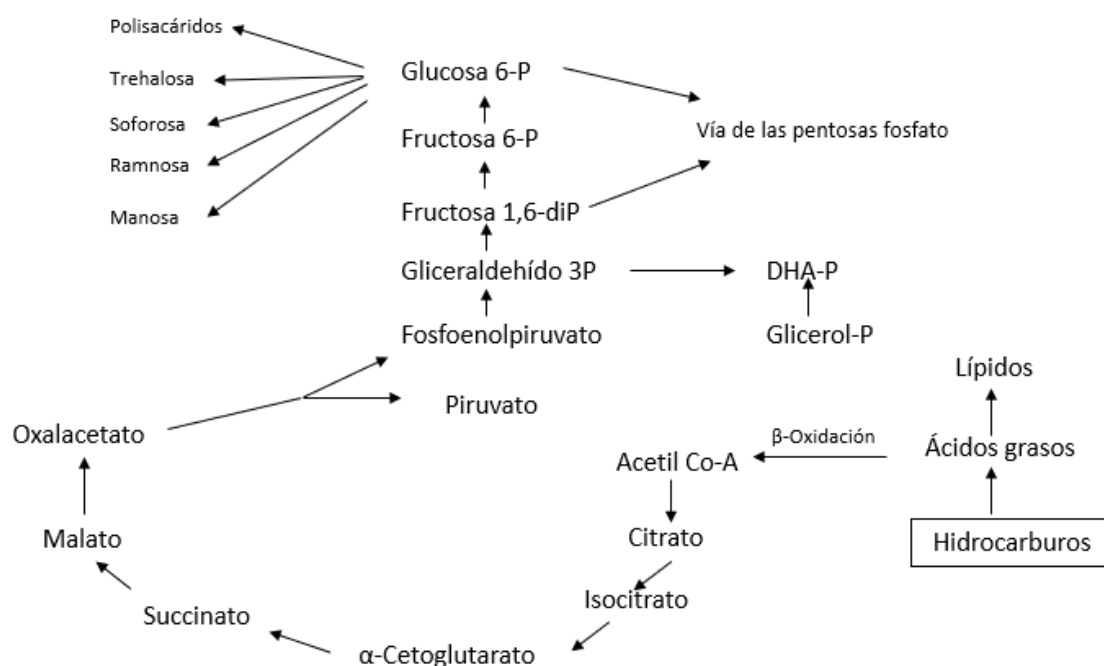


Figura 5. Metabolismo relacionado a la síntesis de precursores de biosurfactantes, utilizando como fuente carbono sustratos inmiscibles con el agua como hidrocarburos (Gráfica modificada de Santos *et al.*, 2016).

Las distintas combinaciones de precursores que pueden surgir durante la síntesis, a partir de las fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo presentes en el entorno o medio de cultivo dependiendo del microorganismo, darán lugar a los diversos tipos de biosurfactantes que existen en la actualidad: glicolípidos, lipopéptidos, lipoproteínas, polisacáridos, etc.

La segunda fase de síntesis de BS que involucra el metabolismo se centra en dos diferentes rutas metabólicas primarias, para dar lugar a sus partes, hidrofílica e hidrofóbica. Ambas rutas utilizan conjuntos enzimáticos específicos, los cuales, en un principio, son enzimas reguladoras. Por lo tanto, estas vías metabólicas presentan algunas características en común de su síntesis y regulación (Hommel y Ratledge, 1993). Ésta última está descrita por tres mecanismos, la inducción, represión y por la regulación dependiente de iones metálicos o nitrógeno (Desai y Banat, 1997).

Existen diversas posibilidades para la síntesis de estos compuestos (Syldatk y Wagner, 1987):

1. Las partes hidrofílicas e hidrofóbicas son sintetizadas a partir de distintos precursores, es decir, *de novo*, por dos caminos independientes.
2. La parte hidrofílica se sintetiza *de novo*, mientras que la síntesis de la parte hidrofóbica es inducida por el sustrato.
3. La parte hidrofóbica se sintetiza *de novo*, mientras que la síntesis del resto hidrofílico depende del sustrato.
4. La síntesis de ambas partes, hidrofílica e hidrofóbica, depende del sustrato.

Posteriormente, la parte hidrofílica e hidrofóbica se unen mediante interacciones de tipo Van der Waals. Una vez sintetizado el BS extracelularmente, éste es liberado de la membrana celular de la bacteria

obteniendo finalmente el BS en contacto con el medio en el que se encuentran los microorganismos productores.

Extracción de biosurfactantes

La extracción de los biosurfactantes mediante el fenómeno de la precipitación se puede llevar a cabo a través de tres técnicas:

1. Cambio de pH: acidificación del medio, en donde el valor del punto isoeléctrico del biosurfactante esté alejado del valor del potencial de hidrógeno. Usualmente el pH se disminuye hasta un valor de 2, utilizando HCl o H₂SO₄ concentrados, para garantizar la formación de precipitado, constituido por el BS (Jenny *et al.*, 1991; Joshi *et al.*, 2016).
2. Extracción con solventes: se fundamenta en el cambio de polaridad. Son utilizados como agentes precipitantes mezclas de solventes orgánicos o sus compuestos independientes, en los cuales el BS es poco soluble o no soluble. Se emplean alcoholes, cloroformo, acetona, acetato de etilo, diclorometano, hexano, etc. (Gautam *et al.*, 2014; Vasanthakumari *et al.*, 2015).
3. Combinación de las técnicas anteriores: en primer lugar, se precipita el BS acidificando el medio y posteriormente, se termina de extraer agregando un solvente orgánico (El-Sheshtawy *et al.*, 2015).

Ambas técnicas son aplicadas al sobrenadante obtenido de la centrifugación o filtración para separar las células microbianas del medio de cultivo (Roca *et al.*, 2015).

Posteriormente, el BS es recuperado por centrifugación y se le realizan lavados, bien sea con el agente precipitante o agua acidificada, para finalmente obtener el BS parcialmente purificado.

Para aquellos estudios o análisis que implican BS con mayor grado de pureza, como compuestos de grado alimenticio, es necesario someterlo a procesos de purificación más rigurosos.

Purificación de biosurfactantes

Se han empleado diferentes técnicas para purificar BS, dentro de las cuales se encuentran procedimientos que involucran membranas (diálisis y ultrafiltración) (Vasanthakumari *et al.*, 2015; Priyanka *et al.*, 2015), cromatografía de gases y de líquidos (Cooper y Goldenberg, 1987; Sharma *et al.*, 2014; Kiran *et al.*, 2017) y recristalización empleando solventes orgánicos variados (Liu *et al.*, 2016; Ndlovu *et al.*, 2017).

Identificación y caracterización de biosurfactantes

Se emplean diversas técnicas analíticas para identificar los grupos funcionales que conforman los BS, y se emplean otras técnicas más sofisticadas para finalmente elucidar su estructura completamente. A continuación, se describen las técnicas más utilizadas para identificar la estructura de los BS:

- Cromatografía de capa fina: utilizando una placa de sílica gel que actúa como fase estacionaria y una mezcla de solventes que representan la fase móvil, se puede conocer la naturaleza de los componentes, polares, medianamente polares o no polares, que conforman al BS en estudio, dependiendo de los parámetros de retención determinados, pudiendo así, arrojar una idea de los posibles grupos presentes en la muestra (azúcares, lípidos, proteínas, etc.) (Jenny *et al.*, 1991)
- Infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR): técnica analítica utilizada para elucidar parcialmente los grupos funcionales y tipos de enlaces químicos presentes en los compuestos (Kiran *et al.*, 2017).
- Espectrometría de masas: permite establecer la distribución de las moléculas de una sustancia en función de la relación masa/ carga de los iones. Usualmente se utiliza acoplada a un cromatógrafo de gases (Anjum *et al.*, 2016).

- Resonancia magnética nuclear del H^1 y C^{13} : se utilizan para la determinación de la estructura química y cambios conformacionales de los compuestos. Es la técnica analítica más utilizada para la elucidación de las estructuras de los BS (Fooladi *et al.*, 2016).

Pruebas preliminares para confirmar la actividad superficial de los BS

Existen varias pruebas preliminares o de cribado que se realizan para observar si un compuesto presenta actividad superficial o carece de ésta (ver tabla 2). Sin embargo, la obtención de resultados positivos o negativos en estas pruebas, en algunos casos, no se relacionan directamente con la capacidad que tienen los compuestos en estudio de disminuir la TS y la TI. Para ellos es necesario el empleo de técnicas cuantitativas, por ejemplo, la determinación de TS o TI mediante tensiómetros.

Tabla 2. Pruebas preliminares para la evaluación de actividad superficial.

Prueba	Fundamento
Actividad hemolítica	Capacidad que tienen los BS de lisar los eritrocitos presentes en el agar sangre ya que su membrana está formada por una bicapa lipídica (proteínas, lípidos y carbohidratos) que interactúan por fuerzas electrostáticas. Los BS forman micelas y su parte no polar interactúa con la parte no polar de los lípidos y esta unión rompe las interacciones hidrofóbicas existentes entre lípidos-proteínas destruyendo la bicapa lipídica. Se evidencia un resultado positivo con la formación de un halo incoloro alrededor del cultivo microbiano (Carrillo <i>et al.</i> , 1996).
Dispersión del aceite	Formación de una zona clara entre el aceite y la muestra debido a la disminución de la TI. El resultado será positivo si se observa la formación de la zona clara (Morikawa <i>et al.</i> , 2000).
Colapso de la gota	Desestabilización de gotas líquidas. Se colocan gotas de una suspensión celular o de sobrenadante de cultivo en una superficie sólida

	<p>lisa recubierta de aceite. Si la muestra no contiene BS, las moléculas de agua son repelidas desde la superficie hidrofóbica, las gotas permanecen estables. Si la muestra contiene BS, las gotas se extienden (colapsan) debido a que se reduce la TI entre la gota de muestra y el aceite (Schulz <i>et al.</i>, 1991).</p>
Índice de emulsificación	<p>Formación de una solución emulsificada como resultado de la disminución de la TI entre dos fases de diferente polaridad (Cooper y Goldenberg, 1987).</p>

Aplicaciones de los biosurfactantes

- **Industria farmacéutica:** los BS son utilizados como agentes antimicrobianos, hemolíticos, antivirales, antitumorales e insecticidas debido a su capacidad para formar poros y desestabilizar la membrana biológica (Bhadoriya *et al.*, 2013; Banat *et al.*, 2014a). También se ha reportado que existe un efecto sinérgico al mezclar soforolípidos y un antibiótico (Joshi-Navare y Prabhune, 2013).
- **Industria alimenticia:** los BS controlan la textura y la vida útil de los productos que contienen almidón, mejoran la consistencia y textura de los productos a base de grasa (helados y productos de pastelería), estabilizan los sistemas aireados y modifican las propiedades reológicas de la masa de trigo (Joy *et al.*, 2017).
- **Industria cosmética:** los BS son utilizados ampliamente por sus propiedades emulsificantes, espumantes, capacidad de unión al agua, propiedades de dispersión y humectación, por lo que son empleados en repelentes de insectos, mascara para pestañas, lápices labiales, pasta de dientes, limpiadores de dentina, etc. (Gharaei-Fathabad, 2011; Varvaresou y Iakovou, 2015).
- **Industria ambiental:** mejoran las tasas de disponibilidad de los contaminantes orgánicos (presentes en aguas o suelos) por lo que aumenta su tasa de biodegradación (Liu *et al.*, 2016) permitiendo su uso en la bioremediación.
- **Industria textil:** preparación de fibras, teñido e impresión y acabado de textiles debido a la capacidad que presentan los BS de humectación y

ablandamiento, penetración, solubilización, emulsificación, detergencia y dispersión (Helmy *et al.*, 2011).

- Agricultura: los BS pueden usarse como plaguicidas, para aumentar la biodisponibilidad de nutrientes para microorganismos beneficiosos asociados a plantas y para mejorar la calidad del suelo agrícola mediante la bioremediación de suelos (Sachdev y Cameotra, 2013).
- Nanotecnología: se emplean BS para la síntesis de nanopartículas debido a su capacidad de emulsificante y estabilizante (Vijayakumar *et al.*, 2015; Saravanan *et al.*, 2017).
- Limpieza: los BS pueden ser utilizados como detergentes (Banat *et al.*, 2010).

ANTECEDENTES

El primer biosurfactante reportado fue un lipopéptido, específicamente surfactina, producida por *Bacillus subtilis* (Arima *et al.*, 1968). Posteriormente, en 1991, se estudió la capacidad emulsificante y solubilizante de compuestos insolubles en fases acuosas utilizándolos como fuente de carbono (Francy *et al.*, 1991). Para el año 1996, se obtuvieron los primeros reportes de biosurfactantes con actividad antimicrobiana (Lin, 1996).

Desde entonces, muchos han sido los estudios de biosurfactantes producidos por bacterias del género *Bacillus*, en donde han sido empleados en diversas aplicaciones, entre ellas la bioremediación (El-Sheshtawy *et al.*, 2015).

Actualmente existe una gran diversidad de microorganismos reportados que tienen la capacidad de producir biosurfactantes, dentro de los cuales se encuentran diversos géneros de bacterias, hongos y levaduras tales como *Torulopsis*, *Arthrobacter*, *Candida*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Nocardia*, *Rhodoccus*, *Micrococcus*, *Bordetella*, *Trichosporon*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Flavobacterium*, entre otros. Sin embargo, *Bacillus sp.* y *Pseudomonas sp.* destacan como los dos géneros más reportados como productores de BS (Varadavenkatesan y Murty, 2013; Nalini y Parthasarathi, 2013).

Hasta el presente, autores diversos han reportado la producción de BS por parte de *Bacillus sp.*, debido a la capacidad de disminuir considerablemente los valores de tensión superficial e interfacial a concentraciones críticas micelares (CCM) bajas y en algunos casos, a CCM menores que las obtenidas por surfactantes de origen sintético (ver tabla 3).

La CCM se define como la concentración de la solución surfactante a la cual las moléculas crean micelas de forma esférica, indicando de esta manera el rango, generalmente estrecho, de concentraciones que separan los límites, debajo del cual la mayoría del surfactante está en el estado monomérico y por encima del cual prácticamente todos los tensioactivos adicionales entran en el estado micelar (Desando *et al.*, 1986). Su valor puede ser conocido mediante la determinación de propiedades físicas, como la tensión superficial.

Tabla 3. Especies de *Bacillus* productoras de biosurfactantes.

Microorganismos	TS inicial-final (mn/m)	CCM (mg/L)	Composición	Referencia
<i>B. licheniformis</i>	74.66-27.26	40	Lipopéptido cíclico	Lui <i>et al.</i> , 2016
<i>B. pumilus</i>	70-30	120	Lipopéptido	Fooladi <i>et al.</i> , 2016
<i>B. subtilis</i>	50-22	NR	Surfactina	Sakthipriya <i>et al.</i> , 2016
<i>B. flexus</i>	69.8-32.4	46.04	Lipopéptido	Wan <i>et al.</i> , 2016
<i>B. siamensis</i>	70-36.1	NR	Lipopéptido	Varadavenkatesan y Murty, 2013
<i>B. methylotrophicus</i>	63-2	38	Glucolípido	Chandankere <i>et al.</i> , 2014
<i>B. velezensis</i>	71.8-24.8	21.04	Lipopéptido y surfactina	Liu <i>et al.</i> , 2010

NR: no reportado, TS: tensión superficial, CCM: concentración crítica micelar.

Un cultivo microbiano se considera prometedor si logra reducir la TS a ≤ 40 mN/m (Cooper y Goldenberg, 1987) o también si logra disminuir la TS del medio con respecto a la del agua destilada (72-73 mN/m) en 20 unidades (Willumsen y Karlson, 1997).

Bajo el mismo orden de ideas, para disminuir los costos de producción de biosurfactantes a partir de bacterias del género *Bacillus*, se han utilizado como fuente de carbono diferentes sustratos renovables como la tapioca y desechos de papa (Noah *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2000), aceite lubricante (Mercadé *et al.*, 1996), salvado de trigo (Ohno *et al.*, 1992).

Numerosos estudios han reportado el uso de aceites vegetales (canola, maíz, girasol, cártamo, oliva, colza, coco, soya, etc.) para la producción de biosurfactantes debido a que son una fuente de carbono lipídico, constituidos en su mayoría de ácidos grasos insaturados. Estos subproductos generados por las industrias de procesamiento de aceites también contienen otros componentes que le otorgan un valor agregado a estos sustratos para la producción de BS (ácidos grasos libres, mono-, di- y triacilglicéridos, pigmentos, esteroides, tocoferoles, glicerol, hidrocarburos, glicolípidos y materiales resinosos) (Dumont y Narine, 2007).

JUSTIFICACIÓN

Bacillus sp. es uno de los dos géneros bacterianos reportados con mayor producción de biosurfactantes, puesto que presentan una gran variedad de aplicaciones industriales debido a que la naturaleza de estos compuestos y, por lo tanto, la actividad del biosurfactante varía entre especies del mismo género.

Al presente, las industrias han mostrado un mayor interés por el empleo de biosurfactantes en comparación con los surfactantes debido a las ventajas presentadas anteriormente.

Sin embargo, su producción implica altos costos y para que llegue a ser comercialmente competitivo con los tensioactivos sintéticos, se deben buscar alternativas de sustratos económicos, a partir de los cuales se obtengan altos rendimientos para poder potenciar el uso industrial de los biosurfactantes.

CAPÍTULO II

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La actividad surfactante del exopolímero producido por una bacteria *Bacillus sp.* será igual o mayor a la actividad obtenida mediante el empleo de surfactantes sintéticos.

Objetivos

Objetivo general

Determinar la actividad surfactante del exopolímero producido por una bacteria *Bacillus sp.* aislada de un consorcio microbiano recolectado en el estado de Nuevo León.

Objetivos específicos

1. Seleccionar la cepa *Bacillus sp.* con mayor actividad surfactante.
2. Extraer y purificar el exopolímero.
3. Determinar la actividad surfactante del exopolímero.
4. Optimizar la producción del exopolímero.
5. Caracterizar parcialmente la composición del exopolímero.

CAPÍTULO III

MATERIALES

Muestras y materiales

Material biológico: las cepas de *Bacillus sp.*, *E. coli* y *S. aureus* utilizadas en este proyecto fueron obtenidas de la colección de cultivos del laboratorio de Biotecnología del Centro de Laboratorios Especializados (CELAES), de la facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, México. Los microorganismos fueron almacenados a -20°C en glicerol al 50% en tubos Eppendorf de 1.50 mL.

Las cepas *Bacillus licheniformis* LB 04 y *Bacillus licheniformis* LB 05 fueron previamente aisladas de pozos de agua y las cepas 1.1 y 1.2 de muestras de suelo del municipio de Mina, Nuevo León: 26°19'24.8"N 101°00'22.7"W (Blanco, 2016); mientras que las cepas 3P y *Bacillus sp.* 5P fueron aisladas en el municipio de Mina, Nuevo León: 23°56'54.2"N 99°45'59.9"W (Acosta, 2017).

Materiales: se emplearon vasos de precipitado, matraces Erlenmeyer, pipeta, tubos Eppendorf, tubos Falcon, mechero, membrana de diálisis (MWCO: 6-8 kDa), etc.

Equipos y reactivos

Equipos

Tabla 4. Equipos utilizados para la realización del proyecto.

Equipo	Marca
Agitador para tubos (Vortex)	Lab-line
Autoclave automática	Tuttnauer®
Autoclave vertical	AESA®
Balanza analítica	AND®
Bomba de vacío	Gast Manufacturing Inc. ®
Campana de flujo laminar clase II	Labconco®
Centrífuga refrigerada	Thermo®
Estufa	Lab-line Instruments®
Incubadora con agitación	Barnstead international®
Microcentrífuga	Eppendorf®
Microscopio binocular	Carl Zeiss®
Potenciómetro	Orion®
Refrigerador	Revco®
Liofilizadora	Thermo®

Reactivos

Tabla 5. Reactivos utilizados para la realización del proyecto.

Nombre	Fórmula química	Marca
Ácido clorhídrico	HCl	Desarrollo de especialidades químicas
Cloroformo	CH ₃ Cl	Desarrollo de especialidades químicas
Cloruro de calcio	CaCl ₂	J.T. Baker
Cloruro de sodio	NaCl	Desarrollo de especialidades químicas
D-glucosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	Sigma Aldrich
SDS	NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄	IBI Scientific
Etanol	C ₂ H ₅ OH	Desarrollo de especialidades químicas
Fosfato dibásico de sodio	Na ₂ HPO ₄	Productos Químicos Monterrey, S.A.
Glicerol	C ₃ H ₈ O ₃	Bio Basic Canada Inc.
Hexano	C ₆ H ₁₄	CTR
Hidróxido de sodio	NaOH	CTR
Sulfato de magnesio	MgSO ₄	CTR
Tolueno RA	C ₇ H ₈	CTR
Aceite de aguacate		San Lucas®
Aceite de canola		Capullo®
Aceite de maíz		Mazola®
Aceite de soya		Nutrioli®
Agar bacteriológico		BD Bioxon
Agar Müeller-Hinton		BD Bioxon
Agar nutritivo		BD Bioxon
Base de agar sangre		BD Bioxon
Caldo nutritivo		BD Bioxon
Extracto de levadura		E.M. Science

METODOLOGÍA

1. Crecimiento de cultivos bacterianos.

Se sembraron seis cepas bacterianas pertenecientes al género *Bacillus* (*B. licheniformis* LB 04, *B. licheniformis* LB 05, 1.1, 1.2, *Bacillus* sp. 3P y *Bacillus* sp. 5P) en caldo PET (ver tabla 6), a pH 7.0, a 37°C por 48 horas a 150 rpm, previamente esterilizado a 121°C a 15 psi por 15 minutos. El pH del medio fue ajustado a 7.0 con HCl 1N y NaOH 1N. Posteriormente fueron sembradas en agar PET, mediante siembra en estría y por último, se realizó tinción Gram para confirmar su pureza.

Tabla 6. Componentes del medio de cultivo PET y PET modificado

Medio PET		Medio PET modificado	
Componente	(g/L)	Componente	(g/L)
CaCl ₂	0.2	CaCl ₂	0.2
MgSO ₄	0.2	MgSO ₄	0.2
Na ₂ HPO ₄	50 nM	Na ₂ HPO ₄	50 nM
C ₆ H ₁₂ O ₆ (glucosa)	20	Aceite de canola	10.46
Extracto de levadura	1	Extracto de levadura	1

1.1 Adaptación de las cepas a la fuente de carbono.

La adaptación de las bacterias a un medio de cultivo en el cual la fuente de carbono estuvo representada solamente por aceite de canola (medio PET modificado), se llevó a cabo variando la concentración de fuente de carbono paulatinamente.

En primer lugar, se utilizó glucosa como única de fuente de carbono (medio PET), hasta llegar al aceite de canola como única fuente de carbono (medio

PET modificado) (Glucosa: Aceite de canola 100:0; 90:10; 80:20; 70:30 ... 0:100).

Todas las fermentaciones fueron llevadas a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con un volumen final de medio de cultivo de 150 mL, a 37°C a 150 rpm por 24 horas.

1.2 Selección de la cepa con mayor actividad surfactante.

Para evaluar la capacidad surfactante de cada una de las cepas se determinó el índice de emulsificación (E24) a diferentes tiempos de la fermentación (24-96 horas). Su determinación se llevó a cabo en tubos de ensayo (100 mm x 15 mm), donde se colocaron 2 mL del compuesto inmisible (aceite de canola) y 2 mL del sobrenadante, obtenido de la centrifugación del medio de cultivo (4,300 rpm a 4°C por 40 minutos) a los distintos tiempos de la fermentación. Se procedió a agitar el tubo de ensayo a alta velocidad durante 2 minutos, para favorecer el mezclado de ambos líquidos y se dejó en reposo por 24 horas a temperatura ambiente. Se utilizó como control positivo una solución de SDS al 10% y como control negativo, medio de cultivo PET modificado sin bacterias.

El E24 fue calculado a través de la siguiente fórmula (Cooper y Goldenberg, 1987):

$$E24 (\%) = \frac{\text{Altura zona emulsificada (cm)}}{\text{Altura total (cm)}} \times 100$$

Además, se realizaron las pruebas de actividad hemolítica, dispersión del aceite y colapso de la gota de las cepas que presentaron mejores resultados de E24. Para la determinación de la actividad hemolítica, las cepas se sembraron en agar sangre al 5% v/v en cajas Petri, y fueron incubadas a 37°C por 48

horas (Carrillo *et al.*, 1996). En las pruebas se utilizó como control positivo una solución de SDS al 10% y como control negativo, agua destilada estéril.

Para la prueba de dispersión del aceite se procedió a medir 40 mL de agua destilada, teñida con colorante cristal violeta para poder observar de manera más clara la dispersión, se colocó en una caja Petri y en el medio de ésta se colocó 50 μ L del compuesto inmiscible (aceite, tolueno y benceno) y en el centro de éste 10 μ L del sobrenadante del medio de cultivo o de la solución de BS (Violeta *et al.*, 2011).

Con respecto a la prueba del colapso de la gota, se cubrió con aceite de canola la superficie de un portaobjetos, sobre la cual se colocó 20 μ L del sobrenadante de la fermentación de 48 horas (Walter *et al.*, 2010).

La cepa bacteriana con mayor actividad surfactante aparente arrojada por las pruebas preliminares fue seleccionada para la continuación de la investigación.

2. Extracción del BS.

Para la producción del biosurfactante se inocularon 10 μ L de un cultivo bacteriano de 24 horas en el medio de cultivo PET modificado previamente esterilizado. Se incubó por 48 horas a 37°C a 150 rpm. Transcurrido el tiempo, para separar el paquete celular del sobrenadante, el medio de cultivo fue centrifugado, en tubos Falcon de 50 mL a 4,300 rpm por 40 minutos a 4°C. Al sobrenadante recuperado se le agregó etanol frío al 96% (-20°C) en proporción 1:2, se agitó vigorosamente por 1 minuto y se dejó en reposo a 4 °C durante 16 horas, para favorecer la precipitación del BS.

Posteriormente, la solución con el BS precipitado se centrifugó a 4,300 rpm por 20 minutos a 4°C, el sobrenadante se descartó y el pellet, fue lavado con 5 mL de etanol frío y vuelto a centrifugar (3X) (Alvarado, 2015).

El sobrenadante se descartó y se agregó 3 mL de hexano al pellet para garantizar que el exopolímero no contuviera restos de aceite provenientes del medio de cultivo. Inmediatamente se prosiguió al filtrado al vacío utilizando un

papel Whatman Ø 125 mm. Una vez filtrado el BS, se dejó en una caja Petri semiabierta para que los restos de hexano se evaporaran y finalmente poder pesar el exopolímero obtenido (Gautam *et al.*, 2014; Parthipan *et al.*, 2017).

Nuevamente se evaluó la actividad surfactante del polímero obtenido, mediante el E24, utilizando una solución de éste al 10% p/v a pH 7.0 y aceite de canola como compuesto inmiscible. Se utilizó como control positivo una solución de SDS al 10% p/v y como control negativo, agua destilada. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

3. Estudio de estabilidad del BS.

Se determinó la estabilidad del polímero a condiciones extremas de pH, temperatura y salinidad en rangos comprendidos entre 3.0-9.0, 30-100°C y 0-20% p/v, respectivamente. Se empleó el E24 como parámetro de cuantificación (Liu *et al.*, 2016; Kiran *et al.*, 2017).

3.1 Efecto del pH sobre la actividad del BS.

Para observar el efecto del pH sobre la actividad surfactante del exopolímero, se utilizaron tres soluciones de BS al 0.4% p/v de pH 3.0, 7.0 y 9.0 respectivamente, ajustando el pH con HCl 1N y NaOH 1N. Se evaluó el efecto mediante el E24 usando como compuesto inmiscible aceite de canola. Las mediciones del índice de emulsificación fueron realizadas a las 24 horas de contacto. Los experimentos se realizaron por triplicado.

3.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad del BS.

La solución de BS al 0.4% que presentó mayor estabilidad a condiciones extremas de pH fue considerada para evaluar la estabilidad del biosurfactante a altas temperaturas, en donde se utilizó aceite de canola como compuesto inmiscible. Las muestras se sometieron a altas temperaturas de 30-100°C

durante una hora, se dejaron enfriar y se midió el E24. Los experimentos se realizaron por triplicado.

3.3 Efecto de la concentración de NaCl sobre la actividad del BS.

La estabilidad del BS en presencia de NaCl se evaluó a través del E24 usando como compuesto inmisible aceite de canola. Se prepararon soluciones de BS al 0.4% p/v con diferentes concentraciones de sal (0-20% p/v). Las mediciones del E24 se realizaron luego de 1 hora de incubación a 37°C. Todas las determinaciones de estabilidad del BS se realizaron por triplicado.

4. Determinación de la actividad surfactante.

Se evaluó la actividad del BS frente a distintos compuestos inmiscibles (aceite de aguacate, soya, oliva, tolueno y hexano) a distintos pH (3-9) mediante el E24 utilizando la ecuación del apartado 1.2.

5. Determinación de la actividad antibacteriana.

Para estudiar la actividad antibacteriana del BS, se utilizó la técnica analítica de espectrofotometría ultravioleta-visible para determinar la DO de las bacterias en contacto con el BS. *E. coli* ATCC 11229 y *S. aureus* fueron utilizadas como representantes de las bacterias Gram negativas y de las Gram positivas, respectivamente.

Se prepararon soluciones de BS con concentración final 0-10 mg/ mL de medio de cultivo, en este caso caldo nutritivo. Se procedió a su esterilización y luego se añadieron 0.05 mL de cada bacteria (DO: 1 a 620 nm). Fueron incubadas a 28°C con agitación a 150 rpm durante 24 horas. Finalmente se realizó la medición de la DO a 620 nm. Se utilizó como blanco el medio de cultivo con BS sin bacterias (Chen *et al.*, 2012). Los experimentos fueron realizados por duplicado.

6. Optimización de la producción de BS.

Para conocer el comportamiento de la producción del biosurfactante, en primer lugar, se realizó un diseño exploratorio de tipo factorial completo general para evaluar si dos variables, la agitación y el tipo de fuente de carbono, eran significativas en la producción del exopolímero. El diseño se llevó a cabo utilizando el programa Minitab® 18.1. Los experimentos se realizaron por triplicado (ver tabla 7).

Tabla 7. Variables evaluadas en el diseño factorial completo general.

Variable	Niveles	Valores de niveles
Agitación	2	Sin agitación
		Agitación (150 rpm)
Fuente de carbono	4	Aceite de canola
		Aceite de maíz
		Aceite de soya
		Aceite de aguacate

Posteriormente, los resultados obtenidos en el diseño exploratorio fueron tomados en consideración para la realización del diseño de optimización de la producción del BS. Para ello, se realizó un diseño de superficie de respuesta tipo Box- Behnken de cinco puntos centrales, utilizando el programa Design Expert 10.0.1.0, en el cual se evaluaron tres factores, temperatura, pH y concentración de la fuente de carbono (ver tabla 8). En ambos casos, la respuesta obtenida estuvo representada por la cantidad de polímero producida por *B. licheniformis* LB 04.

Tabla 8. Variables evaluadas en el diseño de optimización de la producción del BS.

Factor	Rango
Temperatura	28°C - 45°C
pH	5.0 – 9.0

Todas las fermentaciones se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con un volumen final de 100 mL de medio PET modificado, el pH fue ajustado utilizando HCl 1N y NaOH 1N.

El rendimiento del BS fue calculado bajo la condición óptima sugerida por el diseño descrito.

7. Purificación del BS.

Se llevó a cabo una diálisis con agua destilada. Para ello se utilizó un vaso de precipitado de 600 mL dentro del cual se colocó la membrana de diálisis que contenía la solución de BS. Se llenó el vaso con agua destilada hasta cubrir completamente la membrana. Luego de haber transcurrido 24 horas, la solución del BS fue liofilizada para eliminar el contenido de agua en su totalidad, obteniendo finalmente el BS puro y seco (Alvarado, 2015).

8. Caracterización del BS.

Se realizó un análisis de FT-IR al polvo obtenido de la purificación para confirmar su pureza y conocer parcialmente los grupos funcionales y tipos de enlaces químicos presentes en los compuestos. El espectro fue obtenido en el rango de número de onda de $4.000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$ en un espectrómetro Thermo Nicolet IS10 (Laboratorio de Servicios Profesionales, Facultad de Ciencias Químicas, UANL).

9. Disposición de residuos.

La disposición de los residuos generados durante la realización de este proyecto se llevó a cabo, de acuerdo con su naturaleza química, en contenedores proporcionados por el Departamento de Medio Ambiente y Seguridad de la Facultad de Ciencias Químicas, en base a la Norma PR-CLB-

SRR/000, quienes establecen un sistema de recolección y para el posterior confinamiento de los residuos generados.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Crecimiento de cultivos bacterianos.

Fueron reactivadas en caldo PET seis cepas bacterianas proporcionadas por el laboratorio de Biotecnología del CELAES. Para poder describir morfológicamente las bacterias, fueron sembradas en agar PET y por medio de tinciones Gram, se verificó la pureza de cada una de ellas (ver figura 6).

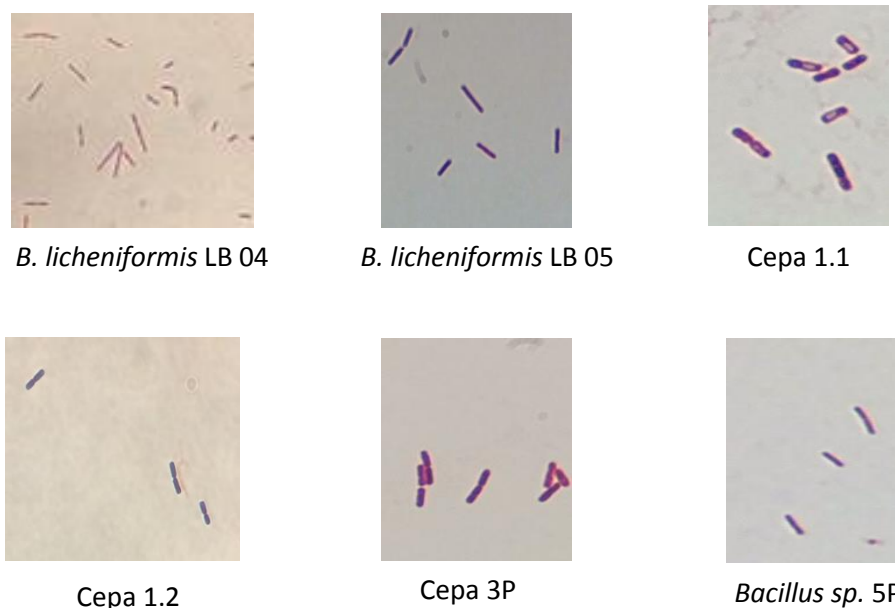


Figura 6. imágenes del microscopio óptico (100X) usando el método de tinción de Gram de las cepas bacterianas reactivadas en caldo PET.

Todas las cepas bacterianas fueron identificadas como bacilos positivos, las cuales tenían formas alargadas y delgadas, como *B. licheniformis* LB 04, LB 05 y *Bacillus sp.* 5P, o bacilos cortos de terminaciones redondeadas como la cepa

3P, 1.1 y 1.2. Todas las cepas en agar PET presentaron un crecimiento de sus colonias color blanquecino y opacas de bordes irregulares.

A continuación, las cepas fueron conservadas a -20°C en glicerol al 50% para estudios posteriores.

1.1 Adaptación de las cepas a una fuente de carbono diferente.

Al momento de sustituir la glucosa por aceite de canola como única fuente de carbono, sólo cinco cepas (*B. licheniformis* LB 04, *B. licheniformis* LB 05, 1.1, 3P y *Bacillus sp.* 5P) fueron capaces de adaptarse al cambio y crecer, mientras que el crecimiento de la cepa 1.2 se vio inhibido completamente.

Esto pudo ser debido a que la fuente de carbono (aceite de canola) presenta una baja disponibilidad al ser un compuesto inmisible con el agua, por lo que la bacteria 1.2 no contiene ciertas propiedades fisiológicas específicas para la degradación del aceite, por lo que no fue capaz de obtener la fuente de carbono indispensable para su crecimiento (Bastiaens *et al.*, 2000).

Brevemente, estas propiedades favorecen la transferencia del sustrato inmisible mediante tres mecanismos, la producción de BS o el uso de componentes membranales con capacidad emulsificante, sistemas de captación con alta afinidad por el sustrato que dan lugar al transporte por difusión facilitada del compuesto hidrofóbico y la presencia de estructuras en la superficie celular que reducen la distancia entre las células y el sustrato promoviendo la adhesión a las superficies hidrofóbicas.

Asimismo, se continuó observando la producción de exopolímero durante el transcurso de las fermentaciones en los matraces de las cinco bacterias. Este producto se pudo evidenciar de forma clara en algunos matraces, por la formación de precipitados polimorfos (*B. licheniformis* LB 04, 1.1 y *Bacillus sp.* 5P). En el caso de *B. licheniformis* LB 05 y la cepa 3P, no se observó la formación de un precipitado tan abundante como en los casos anteriores (ver figura 7).

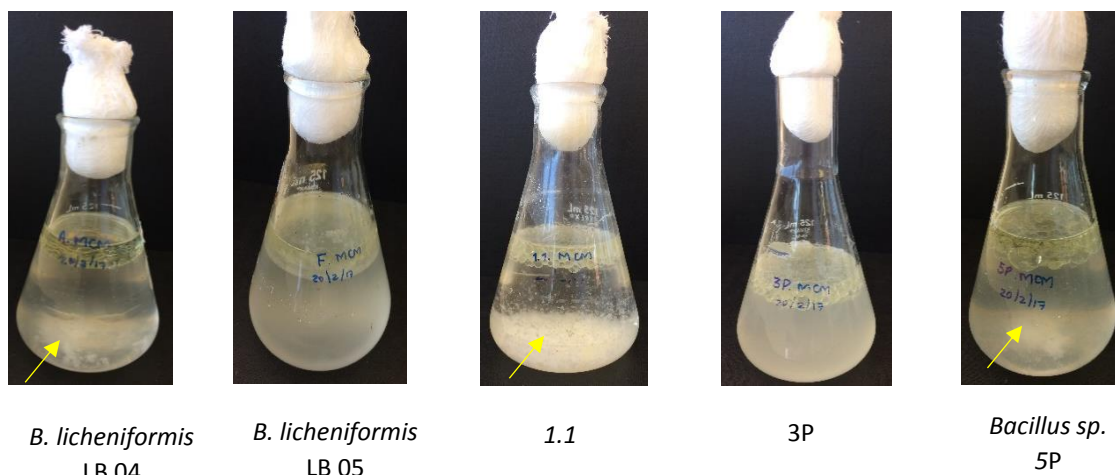


Figura 7. Producción de exopolímeros utilizando aceite de canola como única fuente de carbono.

1.2 Selección de la cepa con mayor actividad surfactante.

Se realizaron cuatro pruebas preliminares para conocer si los exopolímeros producidos por las cepas tenían actividad surfactante.

El índice de emulsificación fue el parámetro semi-cuantitativo utilizado para evaluar la actividad surfactante de los exopolímeros producidos, en donde el compuesto inmiscible fue el aceite de canola y la fase acuosa estuvo constituida por el sobrenadante libre de células, obtenido luego de centrifugar el medio de cultivo a diferentes tiempos de la fermentación.

En la figura 8 se puede observar que las cepas *B. licheniformis* LB 05 y *Bacillus sp.* 5P presentan un comportamiento de su actividad surfactante parecido el cual va disminuyendo y a partir de las 72 horas de fermentación su actividad se ve ligeramente favorecida. En cuanto a la cepa 3P, alcanza su actividad máxima a las 48 horas de fermentación y luego ésta disminuye

paulatinamente. En el caso de las cepas *B. licheniformis* LB 04 y la cepa 1.1, las cuales presentan una actividad máxima a las 24 horas de la fermentación y a continuación, ésta disminuye gradualmente.

Esta disminución de la actividad biosurfactante puede estar atribuida a que, a partir de las 24 horas de la fermentación, la fuente de carbono proveniente del aceite de canola se comienza a agotar y por lo tanto el BS producido comienza a actuar como fuente de carbono por lo que es degradado por las células bacterianas, lo que conlleva a una disminución de la actividad biosurfactante.

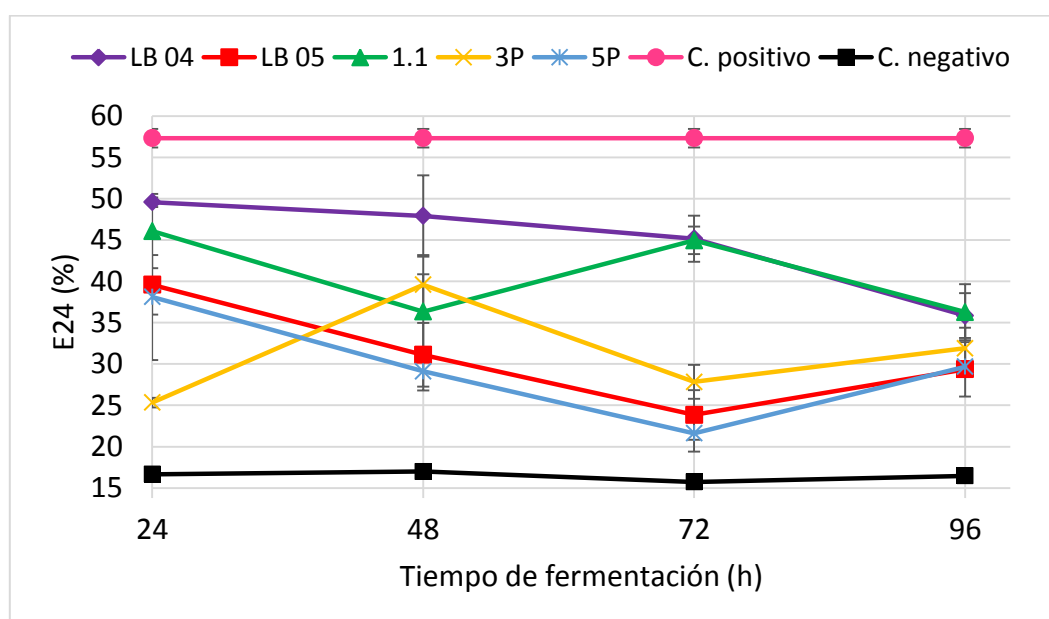


Figura 8. Índice de emulsificación (E24) de las cepas bacterianas a diferentes tiempos de la fermentación.

Por mostrar una actividad biosurfactante mayor, demostrado por los valores de E24 obtenidos, las bacterias *B. licheniformis* LB 04 y la cepa 1.1 fueron seleccionadas para la continuación del proyecto.

Se les evaluó la actividad hemolítica, a través de la cual se evidenció la producción de compuestos BS, mediante la formación de halos incoloros alrededor de las colonias bacterianas a las 48 horas de incubación, iguales al presentado por el control positivo.

La actividad hemolítica anteriormente también ha sido reportada positiva por bacterias productoras de BS (Mouafi *et al.*, 2016).

Igualmente se determinó la actividad hemolítica del BS producido, a través de la preparación de una solución de BS al 10% p/v, arrojando un resultado negativo. Este resultado preliminar sugiere que el BS no tiene actividad citotóxica, por lo que su uso puede ser considerado en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética. Sin embargo, es necesario realizar pruebas citotóxicas para confirmarlo.

La prueba de dispersión del aceite también fue realizada utilizando aceite de canola, tolueno y benceno como compuestos inmiscibles, sin embargo, para ambas cepas, *B. licheniformis* LB 04 y la cepa 1.1, el resultado fue negativo. No se observó la dispersión del aceite al agregar sobrenadante del medio de cultivo libre de bacterias ni al agregar solución del exopolímero crudo producido al 10%, en comparación al control positivo empleado (solución de SDS al 10%), en donde se observó una dispersión total inmediata del aceite al agregar la solución.

La prueba del colapso de la gota resultó negativa para ambas cepas, ya que no se observó alguna variación de la gota del sobrenadante de la fermentación colocada con respecto al control negativo.

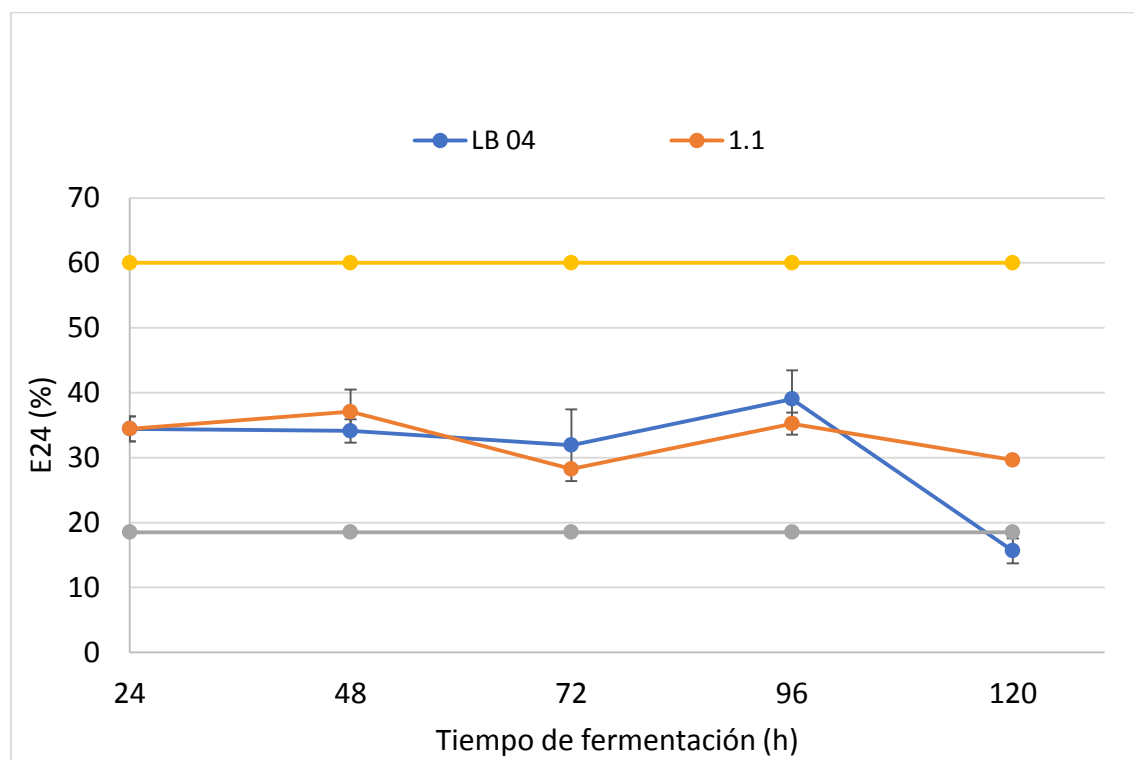
Sin embargo, estas cuatro últimas pruebas realizadas en caso de dar resultados bajos (E24) o negativos (actividad hemolítica, dispersión del aceite o colapso de la gota) no son indicativas directamente de la ausencia de actividad surfactante del compuesto en análisis (Youssef *et al.*, 2004; Fooladi *et al.*, 2016), para poder corroborarlo se sugiere realizar determinaciones de la TS y TI utilizando instrumentos analíticos (tensiómetros).

Con respecto al E24, es una técnica semi-cuantitativa empleada para la determinación de la actividad surfactante ya que se ha encontrado que existe una correspondencia directa entre ésta y la capacidad de emulsificación (Cooper y Goldenberg, 1987). No obstante, diversos autores han reportado que la capacidad emulsificante no está relacionada directamente con la actividad superficial del compuesto (Bosch *et al.*, 1988; Willumsen y Karlson, 1997).

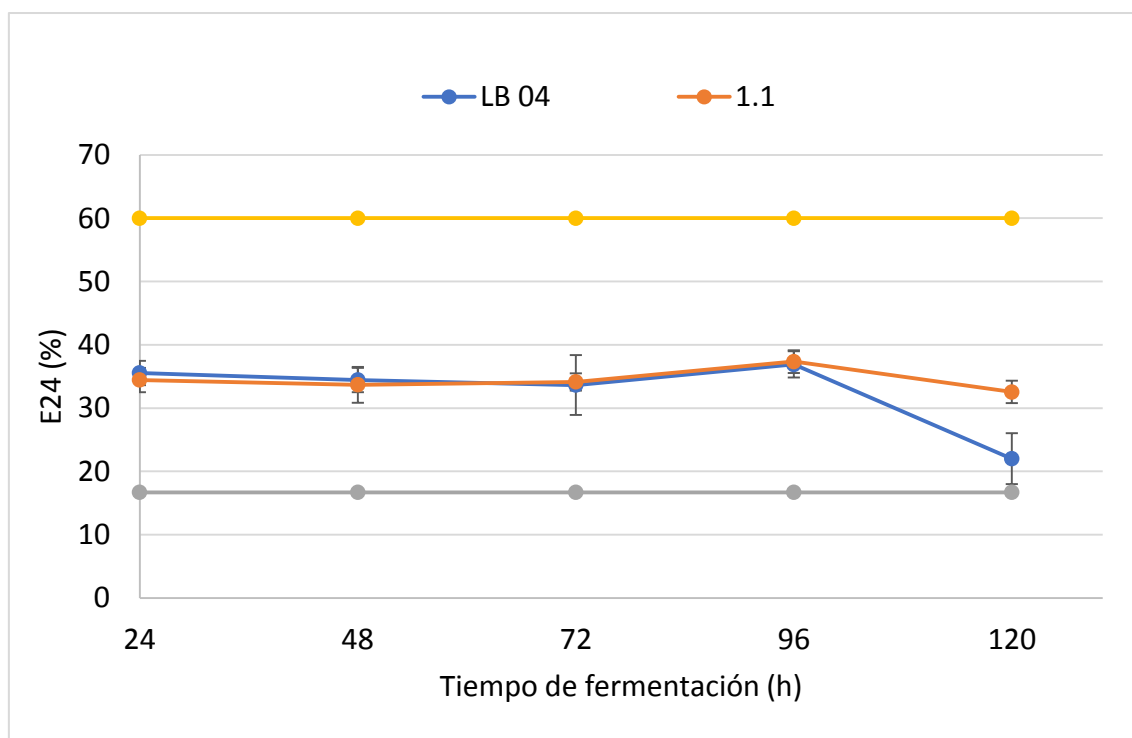
En el caso de la actividad hemolítica, se pueden obtener falsos positivos ya que las bacterias pudieran estar produciendo otros compuestos, como por ejemplo toxinas, capaces de lisar los eritrocitos presentes en el agar sangre o

también pudieran estar involucrados otros factores, por ejemplo, que el BS no sea capaz de difundir en el agar sangre y por lo tanto diera como resultado un falso negativo.

Posteriormente, se calculó el E24 de las cepas seleccionadas utilizando en primer lugar la glucosa como fuente de carbono y en segundo lugar el aceite de canola como única fuente de carbono, con el fin de conocer si la actividad surfactante indicada por esta técnica se veía afectada dependiendo del sustrato disponible en la fermentación. Se utilizó aceite de canola como compuesto inmisible y el sobrenadante de los distintos tiempos de fermentación como fase acuosa. El control positivo empleado fue una solución de SDS al 10% y los controles negativos fueron los respectivos medios de cultivos sin inocular (ver figura 9).



(a)



(b)

Figura 9. Índices de emulsificación obtenidos a partir del medio de cultivo PET (a) sin modificar y (b) modificado. Las barras de error representan la media de experimentos independientes, n=3.

En la tabla 9 se puede apreciar que la respuesta obtenida en ambos casos es similar, los E24 al transcurrir el tiempo oscilan entre 20-40% aproximadamente.

Tabla 9. Índices de emulsificación obtenidos a partir del medio de cultivo PET sin modificar y del medio de cultivo PET modificado.

Tiempo de fermentación (h)/ Cepas	Medio PET sin modificar		Medio PET modificado	
	LB 04	1.1	LB 04	1.1
24	34.4 ± 3.9	34.4 ± 1.99	35.6 ± 1.93	34.4 ± 1.93
48	34.1 ± 1.92	37.1 ± 1.92	34.4 ± 1.93	33.7 ± 2.84
72	31.9 ± 1.81	28.2 ± 3.4	33.6 ± 4.73	34.1 ± 1.37
96	39.0 ± 5.52	35.2 ± 0.57	36.9 ± 2.07	37.3 ± 1.81
120	15.7 ± 4.42	29.6 ± 1.72	22.0 ± 4.04	32.6 ± 1.76

Las barras de error representan la media de experimentos independientes, n=3.

Ha sido reportado que la naturaleza de la fuente de carbono (carbohidratos o lípidos) empleada para la producción de BS se encuentra relacionada con la capacidad emulsificante (E24) y por ende con la actividad superficial de estos compuestos (Anjum *et al.*, 2016), en donde al utilizar un sustrato inmiscible con el agua, la bacteria se ve forzada a producir BS para poder obtener del sustrato la fuente de carbono requerida para su crecimiento (ver tabla 10).

Sin embargo, se observa que capacidad surfactante de las bacterias *B. licheniformis* LB 04 y 1.1 sugerida por el E24, no se ve afectada por el cambio de naturaleza de la fuente de carbono, sabiendo que en medio de cultivo PET sin modificar se encuentra la glucosa disuelta, mientras que en el medio PET modificado el sustrato es de naturaleza hidrofóbica o inmiscible con el agua; lo que evidencia que ambas bacterias contienen enzimas que permiten degradar el lípido, sin afectar la actividad surfactante del exopolímero producido.

Teniendo esto en consideración, se tiene que una de las principales fuentes de carbono utilizada para el crecimiento de microorganismos es la glucosa la cual está valorizada por la compañía Sigma Aldrich en aproximadamente 607.00 pesos MXN por 500g del compuesto. Por otro lado, el precio de los aceites vegetales de uso comercial que se encuentran disponibles para todo público oscila entre 20-60 pesos MXN por 800 mL del aceite.

Sabiendo que 500g de glucosa representan aproximadamente 200g de carbono disponible para el consumo del microorganismo, mientras que la misma cantidad de carbono se encuentra presente en alrededor de 262 mL de aceite vegetal (aceite de canola), es decir, alrededor de un tercio de la botella de aceite en cuestión.

Por lo tanto, realizando una comparación entre las fuentes de carbono planteadas, se tiene que el aceite vegetal representa un sustrato que posiblemente favorece la disminución de costos relacionada a la adquisición de los sustratos del medio de cultivo, sin afectar la actividad superficial del exopolímero obtenido.

Tabla 10. Comparación de los E24 obtenidos de las bacterias *B. licheniformis* LB 04 y la 1.1 a partir de distintas fuentes de carbono con la referencia.

Fuente de carbono/ Cepas	E24 (%) *		Según Anjum <i>et al.</i> , 2016.
	LB 04	1.1	
Glucosa	34.4 ± 3.9	34.4 ± 1.99	17 ± 0.21
Glucosa + aceite (50%- 50%)	41.03 ± 2.85	39.49 ± 4.76	32 ± 0.21
Aceite	35.6 ± 1.93	34.4 ± 1.93	38 ± 0.32

*determinado a las 24 horas de la fermentación. Las barras de error representan la media de experimentos independientes, n=3.

Hasta el momento ambas cepas *B. licheniformis* LB 04 y la 1.1 presentan resultados similares de E24 y para poder seleccionar solamente una de ellas para la continuación del proyecto, se evaluó la actividad de cada uno de los BS producidos a distintos pH, para conocer si al variar las condiciones del medio, la actividad se veía modificada y así poder elegir una de ellas.

En la tabla 11 se puede observar que la actividad superficial arrojada por el polímero producido por *B. licheniformis* LB 04, con un valor de 47.78 ± 1.92 , mientras que el BS producido por la bacteria 1.1 presentó una máxima actividad de 41.67 ± 2.06 , por lo que la cepa por *B. licheniformis* LB 04 fue seleccionada para continuar con la realización del presente trabajo.

Tabla 11. Índice de emulsificación de los polímeros producidos por *B. licheniformis* LB 04 y por la bacteria 1.1 a diferentes pH.

pH/ Cepas	E24 (%)	
	LB 04	1.1
3	47.78 ± 1.92	34.85 ± 2.91
5	36 ± 3.34	37.38 ± 5.63
7	37.2 ± 1.85	35.97 ± 2.37
9	38.3 ± 0.79	41.67 ± 2.06

Las barras de error representan la media de experimentos independientes, n=3.

2. Extracción del BS.

Una vez transcurrido las 48 horas de incubación de las bacterias, se procedió a centrifugar obteniendo el paquete celular separado completamente del sobrenadante que contenía el BS. Al colocarlo en contacto con el agente precipitante (etanol a -20°C) a las 16 horas de reposo a 4°C, se presentó un precipitado de color blanco que fue recuperado mediante centrifugación y después de realizarle los lavados con etanol y hexano, se obtuvo finalmente un sólido suelto de color blanco a partir de ambas bacterias, a los cuales se les realizaron algunas pruebas mencionadas anteriormente (ver figura 10).

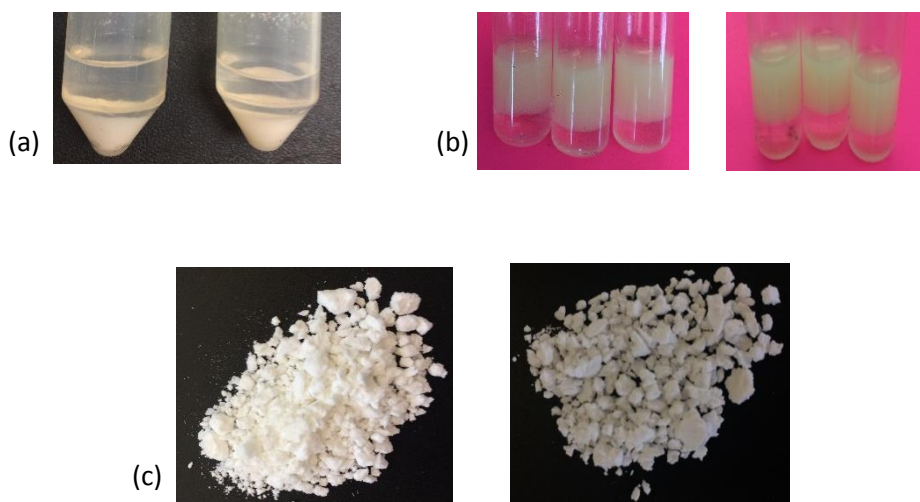


Figura 10. Imágenes de los BS (a) BS recuperado mediante centrifugación, (b) tubos para la determinación de E24 de los BS producidos por *B.licheniformis* LB 04 (derecha) y cepa 1.1 (izquierda) y (c) BS extraídos procedentes de *B. licheniformis* LB 04 (derecha) y cepa 1.1 (izquierda).

3. Estudios de estabilidad del BS.

3.1 Efecto del pH sobre la actividad del BS

La estabilidad del BS a distintos pH fue evaluada utilizando aceite de canola como compuesto inmiscible. En la figura 11 se puede observar que a pH entre 5-9 la variación de la estabilidad no es significativa. Sin embargo, a pH ácidos el BS presenta una actividad ligeramente mayor. Esto constituye un beneficio

para el BS ya que puede ser empleado en aquellos procesos industriales que involucren valores extremos de pH. Resultados similares fueron reportados por Liu y colaboradores en el 2016 y por Gong y colaboradores en el 2009.

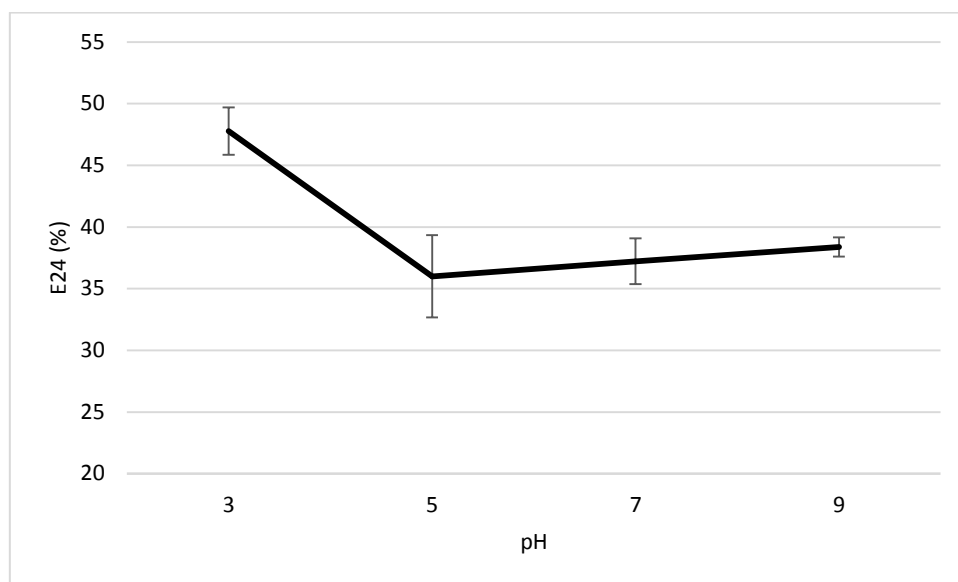


Figura 11. Efecto del pH sobre la actividad del BS. Las barras de error representan la media de experimentos independientes, n=3.

3.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad del BS

Al variar la temperatura de 30 a 100°C se obtuvo que el BS en estudio es termoestable ya que, el E24 observado no fue alterado en un valor mayor al 5% de actividad (ver figura 12). Por lo que el compuesto puede ser empleado en procesos industriales que involucren altas temperaturas, sin variar su actividad, por ejemplo, en la bioremediación (Zhao *et al.*, 2011). Lui y colaboradores obtuvieron resultados similares en donde la temperatura no influyó en las propiedades del BS (Lui *et al.*, 2016). Asimismo, Chandankere y colaboradores en el 2014, reportaron un BS termoestable.

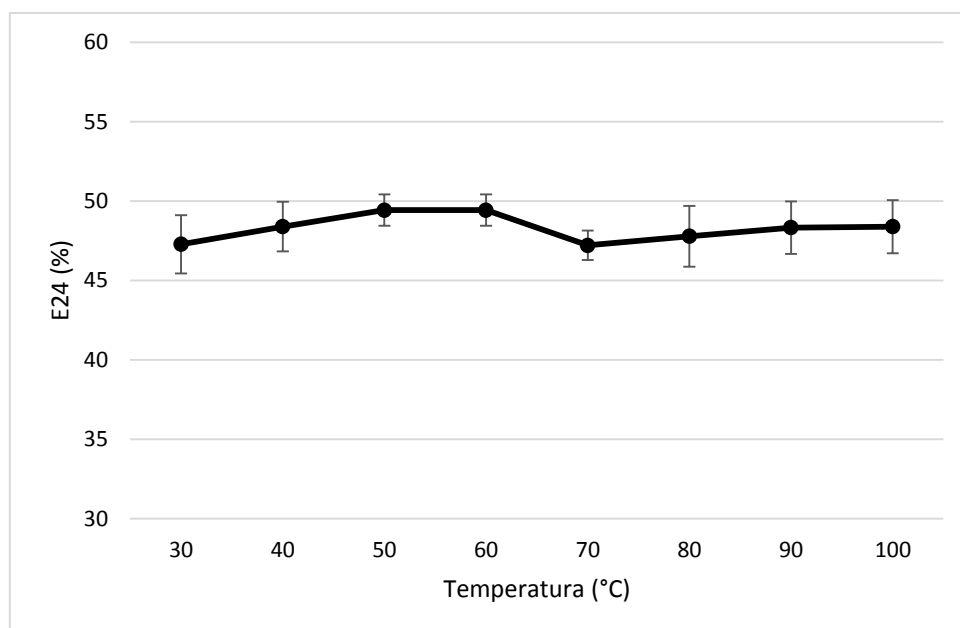


Figura 12. Efecto de la temperatura sobre la actividad del BS. Las barras de error representan la media de experimentos independientes, n=3.

3.3 Efecto de la concentración de NaCl sobre la actividad del BS

Con el fin de evaluar el efecto de la salinidad al variar las concentraciones de NaCl, la actividad obtenida por el BS producido por *B. licheniformis* LB 04 no resultó afectada por la concentración de NaCl lo que representa una ventaja sobre los surfactantes sintéticos, los cuales dependiendo de su naturaleza (iónicos o no iónicos), su actividad puede variar o no en presencia de la sal (ver figura 13). Resultados similares fueron obtenidos por El-Sheshtawy en el año 2015.

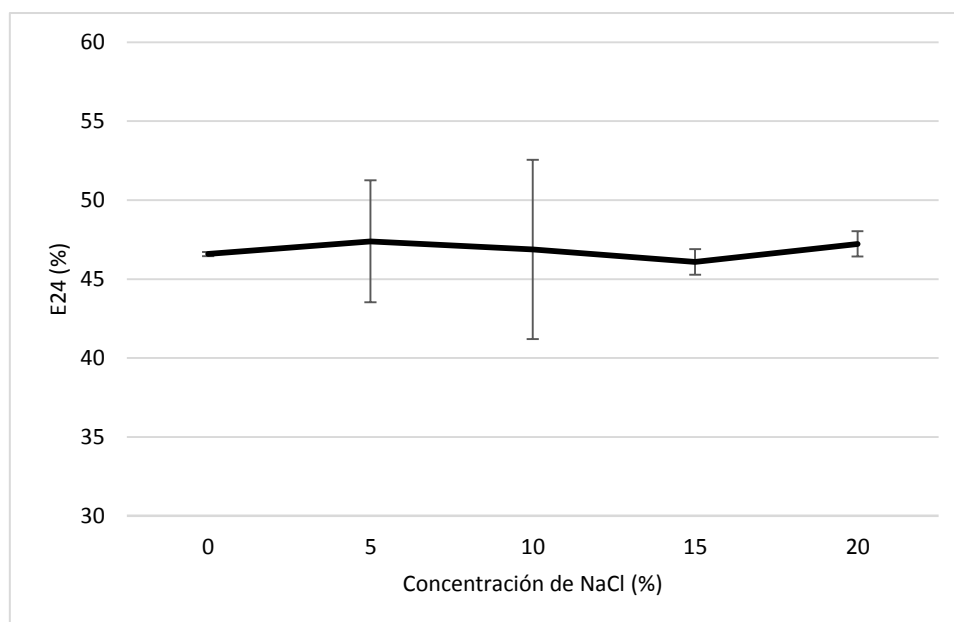


Figura 13. Efecto de la concentración de NaCl sobre la actividad del BS. Las barras de error representan la media de experimentos independientes, $n=3$.

4. Determinación de la actividad surfactante.

Se determinó el E24 del BS frente a distintos compuestos inmiscibles dentro de un rango de pH (3-9). En la figura 14 se puede observar que el BS presenta una mayor actividad frente al aceite de oliva en comparación a los otros compuestos inmiscibles dentro del rango de pH analizado, mientras que frente al hexano a pH 3 y 7, la zona emulsificada formada no presentó una forma regular la cual pudiera ser cuantificada.

Con respecto a la actividad obtenida frente al aceite de canola, aguacate, soya y tolueno, no se vio afectada de manera significativa frente a cambios en el pH.

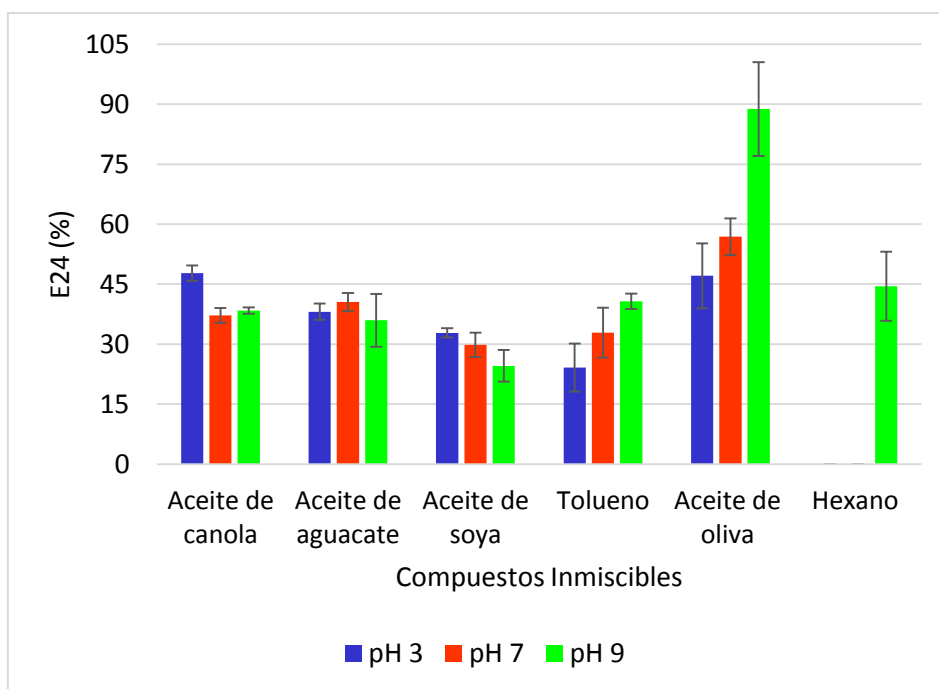


Figura 14. Índice de emulsificación (E24) frente a distintos compuestos inmiscibles. Las barras de error representan la media de experimentos independientes, n=3.

Comparando los resultados obtenidos con los reportados por Liu y colaboradores, los valores de E24 conseguidos por el BS producido por *B. licheniformis* LB 04 frente a aceite de oliva a pH 9 fueron mayores (Liu *et al.*, 2016). Anjum y colaboradores reportaron un E24 de $38,0 \pm 0,32$ % a partir del BS producido por *Bacillus sp.* MTCC 5877, similar al valor producido en este proyecto por BS, $32,81 \pm 1,15$ %.

A pesar de que el BS no fue posible la cuantificación de la actividad surfactante a pH 3 y 7 frente a hexano, la respuesta obtenida a pH 9 ($44,48 \pm 8,7$ %) es semejante a lo reportado por Al-Wahaibi y colaboradores en el año 2014.

5. Determinación de la actividad antibacteriana.

La concentración de bacterias *Escherichia coli* ATCC 11229 y *Staphylococcus aureus* observada en la figura 15, expresada en porcentaje de supervivencia, muestra que a diferentes concentraciones del BS hubo crecimiento bacteriano, por lo que el BS en estudio no posee actividad

antibacteriana. Esto se puede atribuir a que la bacteria *B. licheniformis* LB 04 sintetiza el BS con la finalidad de obtener más disponible el sustrato a partir de una fuente inmiscible con el agua, sin brindarle la capacidad de eliminar a otras bacterias presentes en su entorno. La leve disminución del porcentaje de supervivencia bacteriana al aumentar la concentración del BS en el medio de cultivo pudo ser debida al aumento de la saturación de este último.

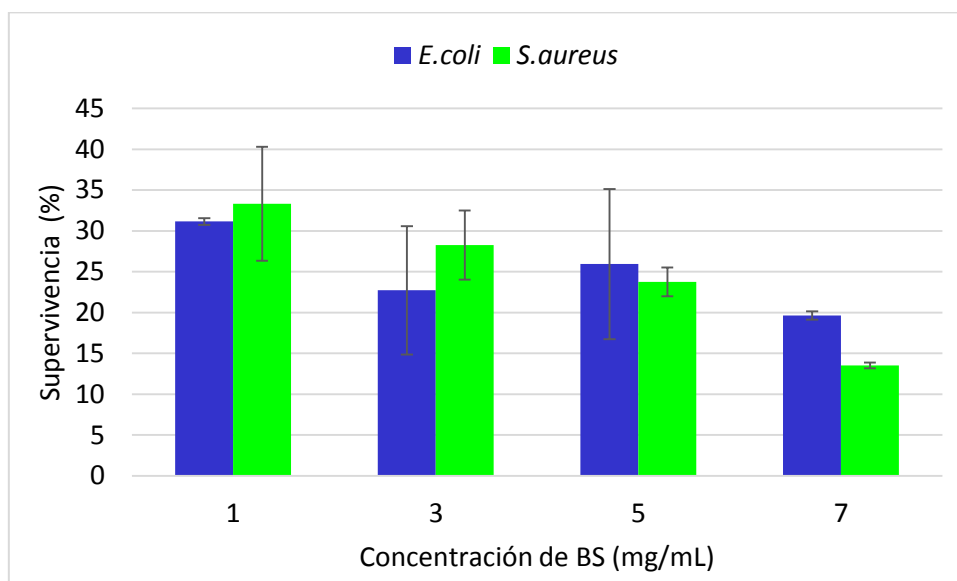


Figura 15. Actividad antibacteriana del BS frente a *E. coli* y *S. aureus*. Las barras de error representan la media de experimentos independientes, n=3.

6. Optimización de la producción de BS.

El diseño exploratorio de tipo factorial completo general se estableció en 16 corridas, las cuales representaron combinaciones entre las variables en estudio (ver tabla 12). Se obtuvo que el modelo de regresión utilizado pudo explicar el 91.74% de la variación de la respuesta obtenida (cantidad de polímero producido por *B. licheniformis* LB 04), sugiriendo la implementación de más experimentos para obtener datos que representen una muestra significativa de la población. De igual forma se conoció que la R^2 está influenciada por menos del 50% por parte de la agitación, y por más del 75 % por parte de la fuente de carbono utilizada, sabiendo que la relación entre las variables y la respuesta obtenida es estadísticamente significativa (valor $p < 0.001$).

Tabla 12. Diseño factorial completo general.

Corrida	Agitación (rpm)	Fuente de carbono	BS (mg)
1	150	Aguacate	814.6
2	0	Canola	869.5
3	0	Maíz	703.5
4	150	Soya	726.1
5	0	Aguacate	651.1
6	0	Canola	927.4
7	150	Maíz	775.2
8	150	Aguacate	801.6
9	150	Canola	946.3
10	0	Maíz	673.4
11	150	Soya	664.9
12	0	Soya	839.0
13	0	Aguacate	674.1
14	150	Maíz	854.1
15	150	Canola	858.2
16	0	Soya	861.6

El diseño mostró que la cantidad de polímero producida durante la fermentación al agitar (150 rpm) o sin agitación es muy parecida (ver figura 16).

Sabiendo que dentro del objetivo de este proyecto se encuentra de forma implícita el deseo de disminuir los costos de producción del BS, realizar las fermentaciones sin agitación es la mejor opción, ya que el consumo de energía se vería drásticamente disminuido.

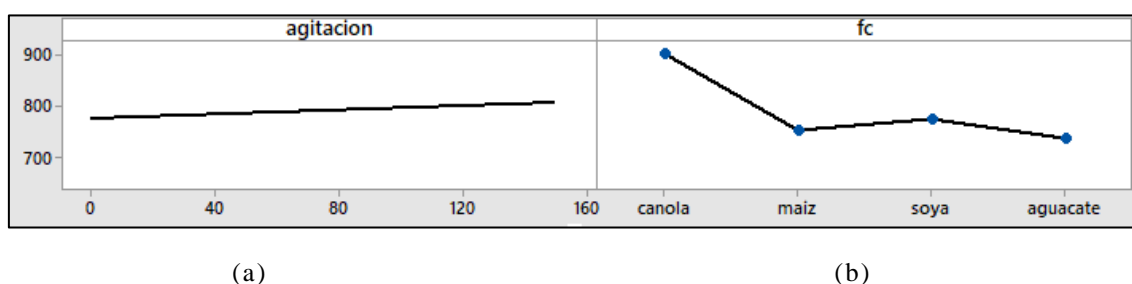


Figura 16. Gráficas de efectos de las variables sobre la producción de BS. (a) Cantidad de polímero en mg vs velocidad de agitación en rpm. (b) Cantidad de polímero en mg vs tipo de fuente de carbono.

Sin embargo, los experimentos se llevaron a cabo con agitación a 150 rpm para poder conocer la producción máxima del BS bajo los parámetros sugeridos por el diseño.

Adicionalmente, el aceite de canola es la mejor fuente de carbono para generar una mayor cantidad de BS, en comparación al aceite de maíz, soya o aguacate.

En cuanto al diseño de optimización de la producción de BS por *B. licheniformis* LB 04, se analizó el efecto del pH, temperatura y concentración de aceite de canola (CC) como única fuente de carbono. El diseño fue descrito en 17 corridas (ver tabla 13), y las respuestas obtenidas se ajustaron a un modelo de orden cuadrático tipo polinomial.

Tabla 13. Diseño de superficie de respuesta tipo Box- Behnken.

Corrida	Temperatura (°C)	pH	CC(g/100mL)	BS (mg)
1	36.5	7	1.25	735.4
2	36.5	5	0.5	753.8
3	36.5	9	2	666.6
4	36.5	7	1.25	761.9
5	36.5	7	1.25	769.1
6	45	9	1.25	949
7	36.5	9	0.5	683.3
8	28	9	1.25	683.3
9	36.5	7	1.25	771.4
10	45	5	1.25	781.3
11	36.5	7	1.25	745
12	28	7	0.5	808.9
13	28	5	1.25	1139.4
14	28	7	2	642
15	45	7	0.5	536.1
16	36.5	5	2	769.3
17	45	7	2	975.8

El análisis de varianza (ANOVA) indica que se puede predecir el 95.36% de los resultados obtenidos ($R^2 = 0.9536$), por lo que la respuesta se ajusta de manera significativa al modelo (ver tabla 14). Adicionalmente, se tiene que pH

es una variable significativa para el modelo ($p < 0.0500$), en comparación a la temperatura y la concentración de fuente de carbono ($p > 0.0500$).

Tabla 14. Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de los cuadrados	df	Media cuadrática	Valor F	Valor p Prob > F	
Modelo	2.966E+005	9	32960.36	15.99	0.0007	significante
A-temperatura	123.24	1	123.24	0.060	0.8138	
B-pH	26634.32	1	26634.32	12.92	0.0088	
C-CC	9408.90	1	9408.90	4.56	0.0700	
AB	97281.61	1	97281.61	47.19	0.0002	
AC	91990.89	1	91990.89	44.63	0.0003	
BC	259.21	1	259.21	0.13	0.7333	
A ²	23619.52	1	23619.52	11.46	0.0117	
B ²	11579.79	1	11579.79	5.62	0.0496	
C ²	37409.43	1	37409.43	18.15	0.0037	
Residual	14428.96	7	2061.28			
Falta de ajuste	14001.27	4	3500.32	24.55	0.0125	significante
Error	427.69	3	142.56			
Total	3.111E+005	16				

En las gráficas de superficie de respuesta que se observan en la figura 17, se puede apreciar que a menor temperatura, menor pH y a bajas concentraciones de aceite de canola, la producción de BS se ve favorecida, mientras que al simular las condiciones en los límites superiores de las variables (pH: 9, T: 45°C y CC: 2g/100 mL), se reduce considerablemente la cantidad de polímero obtenido.

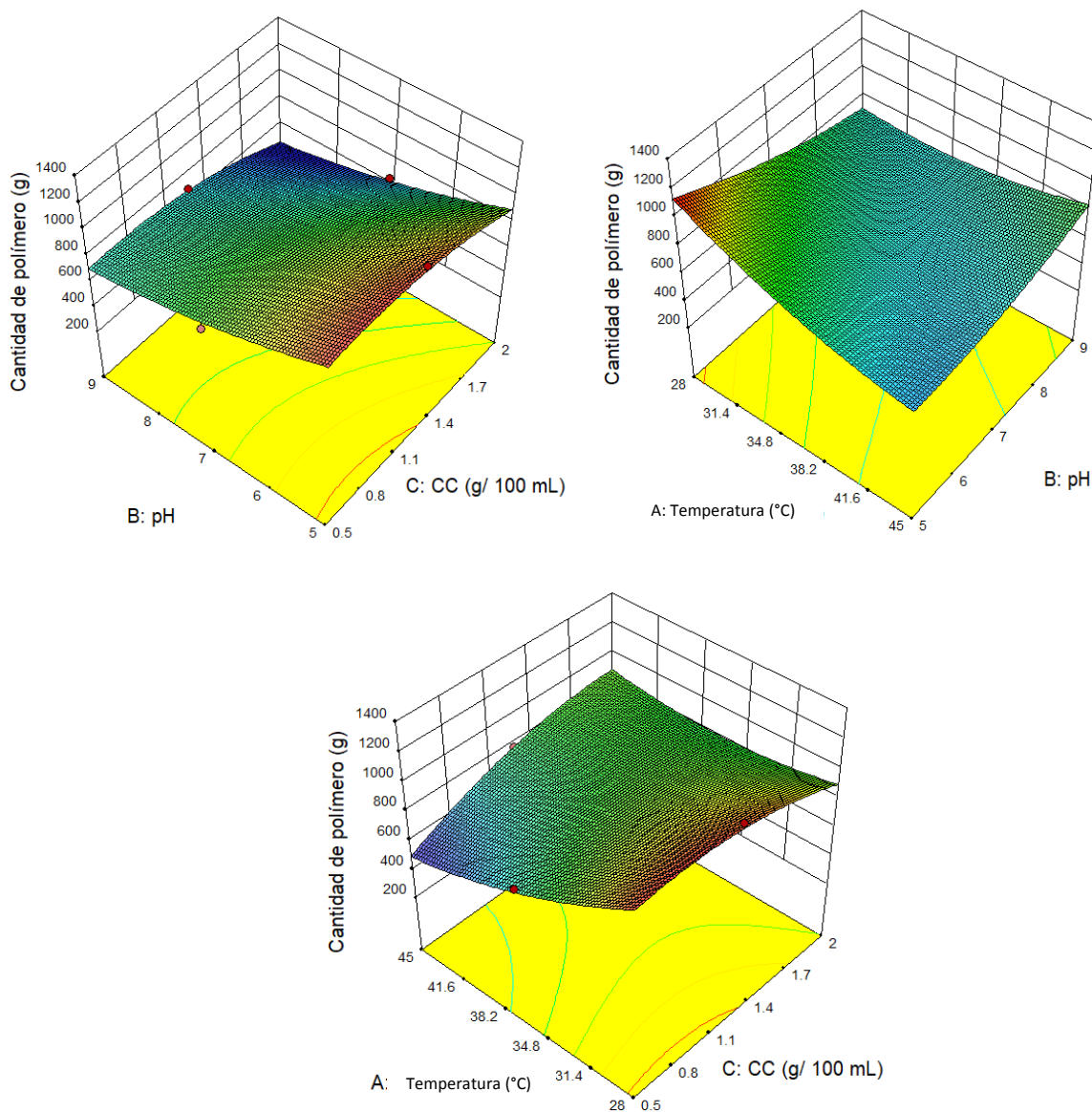


Figura 17. Gráficas de superficie de respuesta.

Basándonos en lo mencionado anteriormente, la condición óptima de producción propuesta por el diseño consistió en una temperatura de 28°C, a pH 5, empleando una concentración de aceite de canola de 0.818 g/ 100 mL de medio de cultivo PET modificado, obteniendo un rendimiento de 1272 mg polímero/100 mL medio de cultivo PET modificado, cuyo valor fue mayor al obtenido inicialmente (739.4 mg BS/ 100 mL medio de cultivo PET modificado) sin optimizar la producción del BS.

Asimismo, al simular la condición óptima sugerida el valor obtenido experimentalmente (1272.2 g/100 mL medio de cultivo), se encontró dentro del

intervalo de tolerancia para el 99% de los datos (TI: 845.513- 1429.2g/ 100 mL) y dentro del intervalo predicho (PI: 989.31- 1285.40) con una confiabilidad del 95%.

7. Purificación del BS.

Luego de haber liofilizado la solución del BS dializada, se obtuvo un polvo blanco.

8. Caracterización del BS.

En la figura 18 se aprecian los espectros de FT-IR para el exopolímero purificado y sin purificar, en donde las bandas presentes a $3,456\text{ cm}^{-1}$ (puro) y $3,460\text{ cm}^{-1}$ (no puro) corresponden a vibraciones del tipo estiramiento asimétrico del enlace N-H pertenecientes a una amina primaria, mientras que las bandas a $3,271\text{ cm}^{-1}$ (puro) y $3,263\text{ cm}^{-1}$ (no puro) se atribuyen a estiramientos del enlace O-H de compuestos hidroxilos.

Asimismo, se tiene una banda de intensidad débil a mediana a $1,633\text{ cm}^{-1}$ (puro) y a $1,625\text{ cm}^{-1}$ (no puro) aunadas a la vibración tipo flexión en el plano del enlace N-H. Además, se encuentra una banda de absorción de intensidad de media a baja correspondiente al estiramiento del enlace no conjugado C-N de amina alifática, bien sea primaria, secundaria o terciaria.

En ambos espectros, se observa una banda de absorción de intensidad fuerte a $1,062\text{ cm}^{-1}$ atribuida al estiramiento asimétrico en el plano del enlace C-O de un alcohol primario.

Se presenta un sobretono alrededor de $2,200\text{-}1,966\text{ cm}^{-1}$ debido a la posible presencia de un grupo aromático.

La diferencia arrojada por el análisis de FT-IR entre las muestras del exopolímero puro y no puro, demuestra que la producción del mismo, tomando en cuenta la etapa rigurosa de extracción, no presenta impurezas que afecten su estructura química o que produzcan cambios significativos en los grupos funcionales presentes.

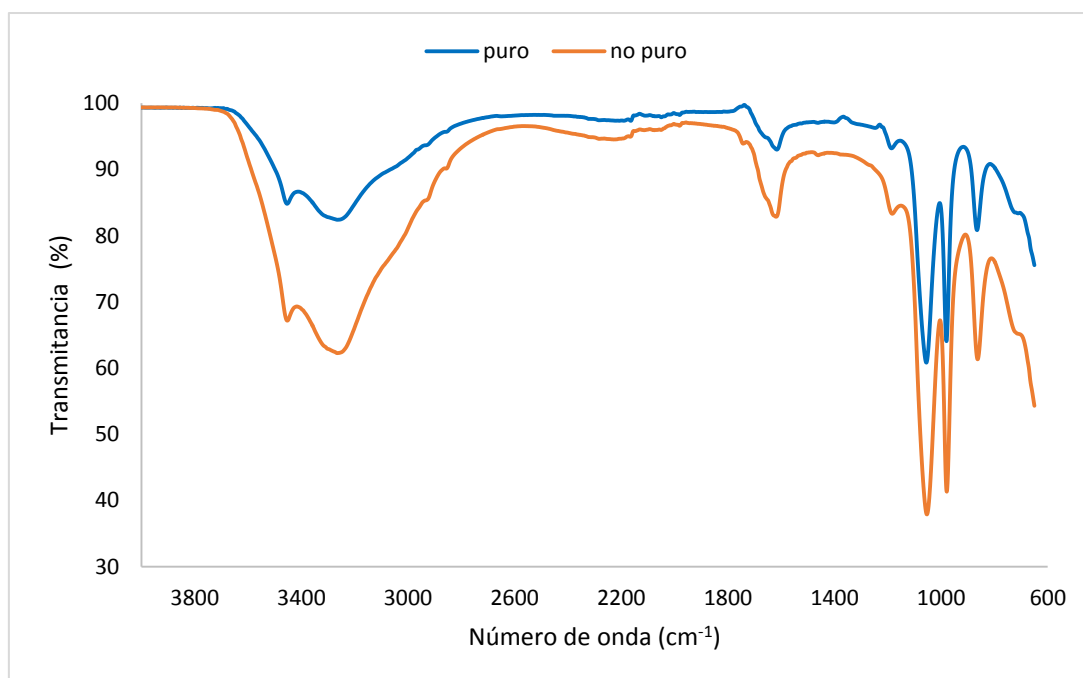


Figura 18. Espectro de FT-IR del BS sin purificar y purificado.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

1. Se reactivaron 6 cepas las cuales resultaron bacilos positivos ante la tinción Gram, de las cuales sólo 5 (*B. licheniformis* LB 04 y 05, 1.1,3P y *Bacillus sp.* 5P) fueron capaces de producir exopolímero utilizando aceite de canola como única fuente de carbono. Dichos exopolímeros mostraron actividad surfactante mediante la determinación del E24 del sobrenadante de la fermentación.
2. Se seleccionó la cepa *B. licheniformis* LB 04 por presentar una mejor actividad surfactante en comparación a las demás cepas bacterianas estudiadas.
3. Se logró extraer el BS producido por *B. licheniformis* LB 04, el cual resultó ser estable a altas temperaturas, condiciones extremas de pH y salinidad, por lo tanto, puede ser utilizado en procesos industriales que involucren condiciones extremas sin evidenciar una alteración de su actividad.
4. El polímero producido presentó actividad surfactante frente a los compuestos inmiscibles estudiados (aceite de canola, aceite de soya, aceite de aguacate y tolueno), mostrando un mejor desempeño frente a aceite de oliva cuando el BS se encontró disuelto en una solución de pH 9.
5. La producción óptima del polímero A se obtuvo a 28°C a 150 rpm y pH 5 a una concentración de aceite de canola de 0.818 g /100 mL, obteniendo un rendimiento de 1272 mg polímero/ 203.8 mg biomasa / 100 mL medio de cultivo PET modificado.
6. Mediante el análisis espectrométrico de FT-IR realizado, se obtuvo que el exopolímero presenta grupos amino y alcoholes dentro de su estructura química.
7. La hipótesis planteada fue rechazada debido a que el exopolímero producido por *B. licheniformis* LB 04 presentó una actividad surfactante menor que los surfactantes sintéticos (SDS).

PERSPECTIVAS

1. Realizar pruebas de citotoxicidad al biosurfactante producido por *Bacillus licheniformis* LB 04, además de estudiar el grado de pureza obtenido una vez purificado el compuesto. Dichos resultados indicarán si el compuesto puede ser utilizado en la industria alimenticia.
2. Determinar la actividad superficial midiendo tensión superficial e interfacial del polímero empleando instrumentos analíticos.
3. Realizar un diseño de optimización de la actividad surfactante, ya que el diseño elaborado tuvo como objetivo aumentar la producción del mismo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta, A. (2017). Evaluación de bacterias aisladas del estado de Nuevo León para identificar la capacidad de acumulación polifosfato como efecto directo de la adquisición de glifosato bajo la limitación de fósforo (tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México.

Al-Wahaibi, Y., Joshi, S., Al-Bahry, S., Elshafie, A., Al-Bemani, A., y Shibulal, B. (2014). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 324-333.

Alvarado, V. (2015). Evaluación del exopolisacárido producido por una bacteria psicrotolerante aislada del noreste de México y sus potenciales aplicaciones industriales. Universidad Autónoma de Nuevo León. México.

Amodu, O., Ntwampe, S. y Ojumu, T. (2014). Optimization of biosurfactant production by *Bacillus licheniformis* STK 01 grown exclusively on beta vulgaris waste using response surface methodology. *BioResources*. 9, 5045-5065.

Anjum, F., Gautam, G., Edgard, G., y Negi, S. (2016). Biosurfactant production through *Bacillus* sp. MTCC 5877 and its multifarious applications in food industry. *Bioresource technology*, 213, 262-269.

Arima, K., Kakinuma, A., y Tamura, G. (1968). Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and biophysical research communications*, 31(3), 488-494.

Banat, I., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M., Fracchia, L. y Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(2), 427-444.

Banat, I., De Rienzo, M. y Quinn, G. (2014a). Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents. *Applied microbiology and biotechnology* 98(24):9915–9929.

Banat, I., Satpute, S., Cameotra, S., Patil, R., y Nyayanit, N. (2014b). Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants production. *Frontiers in microbiology*, 5, 697.

Bastiaens, L., Springael, D., Wattiau, P., Harms, H., Verachtert, H., y Diels, L. (2000). Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 1834-1843.

Bhadoriya, S., Madoriya, N., Shukla, K. y Parihar, M. (2013). Biosurfactants: a new pharmaceutical additive for solubility enhancement and

pharmaceutical development. *Biochemical Pharmacology*. DOI:10.4172/2167-0501.1000113.

Blanco de la Cruz, L., (2016). Oxidación microbiana del glicerol por *Bacillus licheniformis* termotolerante aislado del Noreste de México (tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, Nuevo León, México.

Bosch, M., Robert, M., Mercade, M., Espuny, M., Parra, J., y Guinea, J. (1988). Surface active compounds on microbial cultures: investigation and production of surface active compounds on microbial cultures. *Tenside Detergents*, 25(4), 208-211.

Carrillo, P., Mardaraz, C., Pitta-Alvarez, S. y Giulietti, A. (1996). Isolation and selection of biosurfactant production bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 12:82–84.

Chandankere, R., Yao, J., Cai, M., Masakorala, K., Jain, A. y Choi, M. (2014). Properties and characterization of biosurfactant in crude oil biodegradation by bacterium *Bacillus methylotrophicus* USTBa. *Fuel*, 122, 140-148.

Chen, W., Juang, R. y Wei, Y. (2015). Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 103, 158-169.

Chen, Y., Chiang, T., Liang, T., Wang, I. y Wang, S. (2012). Reclamation of squid pen by *Bacillus licheniformis* TKU004 for the production of thermally stable and antimicrobial biosurfactant. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 1(1), 62-69.

Cooper, D. y Goldenberg, B. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology*, 53(2), 224-229.

Desai, J. y Banat, I. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular biology reviews*, 61(1), 47-64.

Desando, M., McGarvey, B. y Reeves, L. (1996). NMR Spectroscopy and the Effects of Enantiomerism on the Micelle Formation of Potassium N-n-Dodecanoylalaninate. *Journal of colloid and interface science*, 181(1), 331-336.

Dumont, M. y Narine, S. (2007). Soapstock and deodorizer distillates from North American vegetable oils: review on their characterization, extraction and utilization. *Food Research International*, 40 (8):957–974.

El-Sheshtawy, H., Aiad, I., Osman, M., Abo-ELnasr, A. y Kobisy, A. (2015). Production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria. *Egyptian Journal of Petroleum*, 24(2), 155-162.

Francy, D., Thomas, J., Raymond, R. y Ward C. (1991). Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. *Journal of Industrial Microbiology*, 8, 237–245.

Fooladi, T., Moazami, N., Abdeslahian, P., Kadier, A., Ghojavand, H., Yusoff, W. y Hamid, A. (2016). Characterization, production and optimization of lipopeptide biosurfactant by new strain *Bacillus pumilus* 2IR isolated from an Iranian oil field. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 510-519.

Gautam, G., Mishra, V., Verma, P., Pandey, A. K. y Negi, S. (2014). A cost-effective strategy for production of bio-surfactant from locally isolated *Penicillium chrysogenum* SNP5 and its applications. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, 4(6), 1.

Genilloud, O., González, I., Salazar, O., Martín, J., Tormo, J. y Vicente, F. (2011). Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 38, 375–389.

Gharaei-Fathabad, E. (2011). Biosurfactants in pharmaceutical industry: a mini-review. *American Journal of Drug Discovery and Development*, 1(1), 58-69.

Gong, G., Zheng, Z., Chen, H., Yuan, C., Wang, P., Yao, L., y Yu, Z. (2009). Enhanced production of surfactin by *Bacillus subtilis* E8 mutant obtained by ion beam implantation. *Food technology and biotechnology*, 47(1), 27.

Harms, H., Smith, K. y Wick, L.Y. (2010). Microorganism–hydrophobic compound interactions. In: Timmis, K.N. (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer, Berlin Heidelberg.

Harutoshi, T. (2013). Exopolysaccharides of lactic acid bacteria for food and colon health applications. *Lactic Acid Bacteria-R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. InTech.

Helmy, Q., Kardena, E., Funamizu, N. y Wisjnuprpto. (2011). Strategies toward commercial scale of biosurfactant production as potential substitute for it's chemically counterparts. *International Journal of Biotechnology*, 12(1-2), 66-86.

Hommel, R. y Ratledge, C. (1993). Biosynthetic mechanisms of low molecular weight surfactants and their precursor molecules. *Surfactant Science Series*, 3-3.

Hvidsten, I., Mjøs, S., Bødtker, G. y Barth, T. (2015). Fatty acids in bacterium *Dietzia* sp. grown on simple and complex hydrocarbons determined as FAME by GC–MS. *Chemistry and physics of lipids*, 190, 15-26.

Ishigami, Y. (1997). Characterization of biosurfactants. In: EsumiK,Ueno M (eds) *Structure-performance relationships in surfactants*. Dekker, New York, pp 197-226.

Iyer, A., Mody, K. y Jha, B. (2006). Emulsifying properties of a marine bacterial exopolysaccharide. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(1), 220-222.

Janek, T., Łukaszewicz, M., Rezanka, T. y Krasowska, A. (2010). Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard. *Bioresource Technology*, 101(15), 6118-6123.

Jenny, K., Käppeli, O. y Fiechter, A. (1991). Biosurfactants from *Bacillus licheniformis*: structural analysis and characterization. *Applied microbiology and biotechnology*, 36(1), 5-13.

Joshi, S., Al-Wahaibi, Y., Al-Bahry, S., Elshafie, A., Al-Bemani, A., Al-Bahri, A. y Al-Mandhari, M. (2016). Production, characterization, and application of *Bacillus licheniformis* W16 biosurfactant in enhancing oil recovery. *Frontiers in microbiology*, 7, 1853.

Joshi-Navare, K. y Prabhune, A. (2013). A biosurfactant-sophorolipid acts in synergy with antibiotics to enhance their efficiency. *Biomed Research International* DOI:10.1155/2013/512495.

Joy, S., Butalia, T., Sharma, S. y Rahman, P. (2017). Biosurfactant Producing Bacteria from Hydrocarbon Contaminated Environment. *Biodegradation and Bioconversion of Hydrocarbons* (pp. 259-305). Springer Singapore.

Kiran, G., Priyadharsini, S., Sajayan, A., Priyadharsini, G., Poullose, N. y Selvin, J. (2017). Production of Lipopeptide Biosurfactant by a Marine *Nesterenkonia* sp. and Its Application in Food Industry. *Frontiers in microbiology*, 8, 1138.

Kosaric, N. (2001). Biosurfactants and their application for soil bioremediation. *Food Technology and Biotechnology*, 39: 295–301.

Ławniczak, Ł., Marecik, R. y Chrzanowski, Ł. (2013). Contributions of biosurfactants to natural or induced bioremediation. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 97(6), 2327-2339.

Lin, S.C. (1996). Biosurfactants: recent advances. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 66, 109–120.

Liu, B., Liu, J., Ju, M., Li, X. y Yu, Q. (2016). Purification and characterization of biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* Y-1 and its application in remediation of petroleum contaminated soil. *Marine pollution bulletin*, 107(1), 46-51.

Liu, C., You, Y., Zhao, R., Sun, D., Zhang, P., Jiang, J. y Liu, W. (2017). Biosurfactant production from *Pseudomonas taiwanensis* L1011 and its

application in accelerating the chemical and biological decolorization of azo dyes. *Ecotoxicology and environmental safety*, 145, 8-15.

Liu, X., Ren, B., Chen, M., Wang, H., Kokare, C., Zhou, X. y Wang, J. (2010). Production and characterization of a group of bioemulsifiers from the marine *Bacillus velezensis* strain H3. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(5), 1881-1893.

Makkar, R. y Cameotra, S. (1999a). Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. *Journal of Surfactants and Detergents*, 2(2), 237-241.

Makkar, R. y Cameotra, S. (1999b). Structural characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* at 45 C. *Journal of Surfactants and Detergents*, 2(3), 367-372.

Makkar, R., Cameotra, S. y Banat, I. (2011). Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB express*, 1(1), 5.

Mercade, M., Monleon, L., Andres, C., Rodon, I., Martinez, E., Espuny, M. y Manresa, A. (1996). Screening and selection of surfactant-producing bacteria from waste lubricating oil. *Journal of Applied Microbiology*, 81(2), 161-166.

Mishra, A. y Jha, B. (2013). Microbial exopolysaccharides. *The Prokaryotes* (pp. 179-192). Springer Berlin Heidelberg.

Mnif, I. y Ghribi, D. (2015). Review lipopeptides biosurfactants: Mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Peptide Science*, 104(3), 129-147.

Moo-Young, M. (2011). *Comprehensive Biotechnology*. Second edition. Amsterdam, Netherlands: ELSEVIER.

Morikawa, M., Hirata, Y. y Imanaka, T. (2000). A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(3), 211-218.

Moya, R., Tsaousi, K., Rudden, M., Marchant, R., Alameda, E., Garcia, R. y Banat, I. (2015). Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source. *Bioresources Technology*, 198, 231–236.

Mulligan, C. y Gibbs, B. (2004). Types, production and applications of biosurfactants. *Proceedings Of The Indian Academy Of Sciences Section B*, 70(1):31–55.

Nalini, S. y Parthasarathi, R. (2013). Biosurfactant production by *Serratia rubidaea* SNAU02 isolated from hydrocarbon contaminated soil and its physico-chemical characterization. *Bioresource Technology*, 147, 619-622.

Ndlovu, T., Rautenbach, M., Vosloo, J. A., Khan, S. y Khan, W. (2017). Characterization and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a wastewater treatment plant. *AMB Express*, 7(1), 108.

Niaounakis, M. (2015). Definitions of terms and types of biopolymers. *Biopolymers: Applications and Trends* (pp:2-3). United Kingdom: Elsevier Inc.

Nicolaus, B., Kambourova, M. y Oner, E. (2010). Exopolysaccharides from extremophiles: from fundamentals to biotechnology. *Environmental Technology*, 31(10), 1145-1158.

Nicolaus, B., Panico, A., Manca, M. C., Lama, L., Gambacorta, A., Maugeri, T. y Caccamo, D. (2000). A thermophilic *Bacillus* isolated from an eolian shallow hydrothermal vent able to produce exopolysaccharides. *Systematic and Applied Microbiology*, 23(3), 426-432.

Noah, K., Sandra, L., Debby, F., David, N. y Gregory, A. (2002). Development of continuous surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in an air lift reactor. *Applied Biochemical And Biotechnology*, 98–100,803–813.

Nwodo, U., Green, E. y Okoh, A. (2012). Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 14002 14015.

Ohno, A., Takashi, A. y Shoda, M. (1992). Production of a lipopeptide antibiotic surfactin by recombinant *Bacillus subtilis* NB22 using wheat bran substrate. *Biotechnology Letters*, 14,817–822.

Parthipan, P., Sarankumar, R., Jaganathan, A., Amuthavalli, P., Babujanarthanam, R., Rahman, P. y Rajasekar, A. (2017). Biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* A1 and *Pseudomonas stutzeri* NA3 reduce longevity and fecundity of *Anopheles stephensi* and show high toxicity against young instars. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-11.

Poli, A., Di Donato, P., Abbamondi, G. y Nicolaus, B. (2011). Synthesis, production and biotechnological applications of exopolysaccharides and polyhydroxyalcanoates by archaea. *Archaea-An International Microbiological Journal*.

Priyanka, P., Arun, A., Young, C. y Rekha, P. (2015). Prospecting exopolysaccharides produced by selected bacteria associated with marine organisms for biotechnological applications. *Chinese Journal of Polymer Science*, 33(2), 236-244.

Roca, C., Alves, V., Freitas, F. y Reis, M. (2015). Exopolysaccharides enriched in rare sugars: bacterial sources, production, and applications. *Frontiers in Microbiology* ,6, 288.

Rodrigues, L.R., Teixeira, J.A. y Oliveira, R. (2006b). Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, 32, 135–142.

Rosenberg, E. y Ron, E. (1999). High-and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, 52(2), 154-162.

Rosenberg, E., DeLong, E, Lory, S., Stackebrandt, E. y Thompson, F. (2013). *The prokaryotes: applied bacteriology and biotechnology*. Springer Berlin Heidelberg.

Ruiz, B., Chavez, A., Forero, A., Garcia-Huante, Y., Romero, A., Sanchez, M., Rocha, D., Sanchez, B., Rodriguez-Sanoja, R., Sanchez, S. y Langley, E. (2010). Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Crc Critical Reviews In Microbiology*, 36, 146–167.

Sachdev, D. y Cameotra, S. (2013). Biosurfactants in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(3), 1005-1016.

Sakthipriya, N., Doble, M. y Sangwai, J. (2016). Efficacy of *Bacillus subtilis* for the biodegradation and viscosity reduction of waxy crude oil for enhanced oil recovery from mature reservoirs. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 38(16), 2327-2335.

Salager, J-L. (2002). Surfactantes tipos y usos. Cuaderno FIRP S300-A, Módulo de enseñanza en fenómenos interfaciales.

Santos, D., Rufino, R. Luna, J. Santos, V. y Sarubbo, L. (2016). Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. *International journal of molecular sciences*, 17(3), 401.

Saravanan, C., Rajesh, R., Kaviarasan, T., Muthukumar, K., Kavitate, D., y Shetty, P. (2017). Synthesis of silver nanoparticles using bacterial exopolysaccharide and its application for degradation of azo-dyes. *Biotechnology Reports*, 15, 33-40.

Sawyer, L., Grubb, D. y Meyers, G. (2008). Polymer Microscopy. Springer New York, United States. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/978-0-387-72628-1>

Schulz, D., Passeri, A., Schmidt, M., Lang, S., Wagner, F., Wray, V. y Gunkel, W. (1991). Marine biosurfactants, I. Screening for biosurfactants among crude oil degrading marine microorganisms from the North Sea. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 46(3-4), 197-203.

Sharma, D., Mandal, S. y Manhas, R. (2014). Purification and characterization of a novel lipopeptide from *Streptomyces amritsarensis* sp. nov. active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *AMB Express*, 4(1), 50.

Silverstein, R., Webster, F. y Kiemle, D. (2005). Spectrometric identification of organic compounds. 7ma ed. Nueva Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Stal, L. (2015). Exopolymers. M. Gargaud, W. Irvine & R. Amils (Eds.), *Encyclopedia of Astrobiology* (pp. 808-810). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

Syldatk, C. y F. Wagner. 1987. Production of biosurfactants. pp 89–120. In N. Kosaric, W. L. Cairns, and N. C. C. Gray (ed.), *Biosurfactants and biotechnology*. Marcel Dekker, Inc., New York.

Thompson, D., Fox, S. y Bala, G. (2000). Biosurfactants from potato process effluents. *Applied Biochemical and Biotechnology*. 84–86, 917–930.

Varadavenkatesan, T. y Murty, V. (2013). Production of a Lipopeptide Biosurfactant by a Novel *Bacillus* sp. and Its Applicability to Enhanced Oil Recovery. *ISRN Microbiology*, 621519.

Varvaresou, A. y Iakovou, K. (2015). Biosurfactants in cosmetics and biopharmaceuticals. *Letters In Applied Microbiology*. DOI:10.1111/lam.12440

Vasanthakumari, D., Harikumar, S., Beena, D., Pandey, A. y Nampoothiri, K. (2015). Physicochemical characterization of an exopolysaccharide produced by a newly isolated *Weissella cibaria*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 176(2), 440-453.

Vijayakumar, S. y Saravanan, V. (2015). Biosurfactants types, sources and applications. *Research Journal of Microbiology*, 10(5), 181.

Violeta, O., Oana, S., Matilda, C., Maria, C., Catalina, V., Gheorghe, C. y Petruta, C. (2011). Production of biosurfactants and antifungal compounds by new strains of *Bacillus* spp. isolated from different sources. *Romanian Biotechnological Letters*, 16, 84-91.

Walter, V., Syldatk, C., y Hausmann, R. (2010). Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. *Biosurfactants* (pp. 1-13). Springer, New York, NY.

Wan, C., Chen, S., Wen, L., Liu, X., Lee, D. J. y Yang, X. (2016). Biosynthesis, characterization and potentiality of lipopeptides produced by *Bacillus flexus* S1 without inductive carbon sources. *RSC Advances*, 6(88), 85074-85082.

Watkinson, R., y Morgan, P. (1991). Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. In *Physiology of Biodegradative Microorganisms* (pp. 79-92). Springer, Dordrecht.

Willumsen, P., & Karlson, U. (1996). Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. *Biodegradation*, 7(5), 415-423.

Yilmaz, M., Celik, G. Y., Aslim, B. y Onbasili, D. (2012). Influence of carbon sources on the production and characterization of the exopolysaccharide (EPS) by *Bacillus sphaericus* 7055 strain. *Journal of polymers and the environment*, 20(1), 152-156.

Youssef, N., Duncan, K., Nagle, D., Savage, K., Knapp, R. y McInerney, M. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of microbiological methods*, 56(3), 339-347.

Zhao, Z., Selvam, A., y Wong, J. (2011). Synergistic effect of thermophilic temperature and biosurfactant produced by *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 on the biodegradation of phenanthrene in bioslurry system. *Journal of hazardous materials*, 190(1-3), 345-350.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Maryangel Camacho Moreno

Candidato para el grado de:

Maestría en Ciencias con orientación en Microbiología Aplicada

Tesis: EVALUACIÓN DE *Bacillus* sp. COMO POTENCIAL PRODUCTOR DE UN EXOPOLÍMERO CON ACTIVIDAD SURFACTANTE.

Edad: 27

Campo de estudio: Biotecnología.

Biografía: Nacida en Caracas, Venezuela el 06 de febrero de 1991. Hija de María Elena Moreno Coronado y José Ángel Camacho Moreno.

Educación: Egresada de la Universidad Central de Venezuela. Grado obtenido: Farmacéutico. Período: 2008-2015.